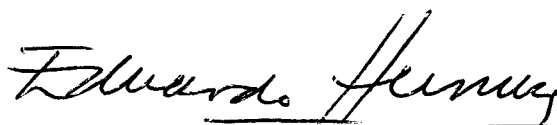
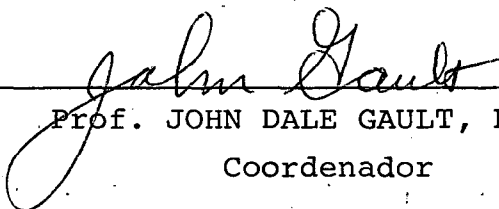


ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE "MESTRE EM CIÊNCIAS"

ESPECIALIDADE EM FÍSICO-QUÍMICA E APROVADA EM SUA FORMA  
FINAL PELO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO.

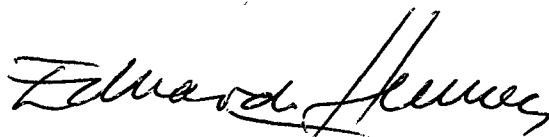


Prof. EDUARDO HUMERES ALLENDE, Ph. D.  
Orientador




Prof. JOHN DALE GAULT, Ph. D.  
Coordenador

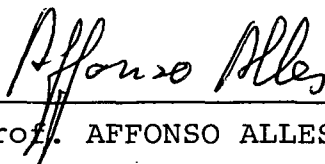
Banca examinadora



Prof. EDUARDO HUMERES ALLENDE, Ph. D.



Prof. FARUK JOSÉ NOME AGUILERA, Ph. D.



Prof. AFFONSO ALLES, Ph. D.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICO-QUÍMICA

ESTUDO COMPARATIVO DO MECANISMO DE HIDRÓLISE DA  
FOSFATASE ALCALINA

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA PARA  
A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS

ALFREDO TIBÚRCIO NUNES PIRES

DEZEMBRO - 1977

À minha esposa OLÍMPIA

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Eduardo Humeres Allen por sua segura orientação e por seu constante apoio durante a laboração deste trabalho.

Ao Professor Faruk José Nome Aguilera um agradecimento especial pelo auxílio prestado. Aos meus colegas Departamento de Química desejo agradecer pelo clima de amizade estímulo que me proporcionaram.

Estendo meus agradecimentos à CAPES.

ÍNDICE GERAL

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

pag.

1.1. Fosfatase Alcalina .....	1
1.2. Cooperatividade Negativa .....	2
1.3. Enzimas "Half Site" .....	4
1.4. Objetivos .....	4

## CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e equipamentos .....	5
2.2. Métodos .....	6

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização das constantes do mecanismo monô- mero-dímero .....	16
3.2. Hidrólise enzimática do p-t-BFF .....	19
3.3. Correlação entre os mecanismos Flip-Flop e monômero-dímero .....	31
3.4. Estudos na etapa transiente .....	37
3.5. Determinação do "Burst" .....	44
3.6. Efeito do íon zinco no espectro do EXE .....	53
3.7. Aminólise do EXE .....	58

BIBLIOGRAFIA .....	64
--------------------	----

ÍNDICE DAS FIGURAS

	pag.
Figura 1 - Absortividade molar do EXE a diversas frações molares de álcool etílico a 25 °C e 283 nm ..	9
Figura 2 - Absortividade molar do 4-nitrofenolato a 25°C e 410 nm .....	10
Figura 3 - Variação do espectro ultra-violeta do EXE em presença de solução aquosa de ZnCl <sub>2</sub> a pH 10 ,	13
Figura 4 - Variação da absorbância versus concentração de cloreto de zinco de uma solução aquosa de EXE a 260 nm .....	14
Figura 5 - Comparação das curvas calculada e experimental através do gráfico de Linewaver-Burk para a hidrólise do p-t-BFF, supondo o monômero / não reativo .....	20
Figura 6 - Hidrólise do p-t-BFF a concentrações variáveis de fosfatase alcalina intestinal de frango	23
Figura 7 - Gráficos das curvas de velocidade versus concentração total de enzima e inverso da velocidade versus inverso da concentração de substrato, calculadas segundo conjuntos de constantes otimizados .....	27
Figura 8 - Diagrama esquemático da função P <sub>1</sub> em função do tempo .....	38
Figura 9 - "Burst" do 2,4-DNF para valores calculados, através de um tratamento aproximado do mecanismo, a diferentes valores de pH .....	43
Figura 10 - Determinação da relação de complexação entre EXE e íons Zn <sup>++</sup> .....	56
Figura 11 - Espectro ultra-violeta da hidrólise do EXE a tempo zero e após dezesseis horas, pH 11 e 25 °C	59
Figura 12 - Espectro ultra-violeta da reação de aminólise do EXE com glicina, a tempo zero e após dezesseis horas de reação, a pH 11 e 25 °C .....	61

ÍNDICE DE TABELAS

	pag.
TABELA I - Absortividade molar do EXE a diversas frações molares de álcool etílico a 283 nm e 25 °C .....	8
TABELA II - Otimização das constantes da hidrólise do p-t-BFF e p-t-AFF catalisada por fosfatase alcalina intestinal de frango .....	21
TABELA III - Dependência da hidrólise do p-t-BFF com a concentração total de fosfatase alcalina intestinal de frango .....	24
TABELA IV - Conjunto otimizado de constantes de dissociação e catalítica do mecanismo monômero-dímero .....	29
TABELA V - "Burst" do 2,4-DNF a diferentes valores de pH .....	41
TABELA VI - Otimização da razão $k_2/k_3$ a distintos valores de pH e $pK_a$ .....	42
TABELA VII - Influência dos íons $Zn^{++}$ na absorbância do EXE .....	57
TABELA VIII - Valores das constantes de segunda ordem para a aminólise de EXE com glicina, glicilglicina, glicinato de etila e ribonuclease .....	63

## RESUMO

O mecanismo de hidrólise de fosfomonoesteres catalisada pela fosfatase alcalina, em especial a de frango, através da dissociação monômero-dímero, foi analisada em relação à necessidade de supor se o monômero era reativo e quais diferenças apresentava com o mecanismo Flip-Flop quando se considerava a reação somente através do dímero. A interpretação de auto-inibição a autoativação a concentrações constantes de enzima é válida tanto o monômero seja ou não reativo. Entretanto, a relação da velocidade diferentes concentrações de enzima total e concentração de substrato constante, somente pode ser interpretada se o monômero for mais reativo do que o dímero.

A principal diferença do mecanismo através somente do dímero, com o Flip-Flop é que este último tem que assumir que alguns dos intermediários não são reativos, com o objetivo obter cinéticas Michaelianas. Tanto o mecanismo monômero-dímero como outros relacionados com a enzima do E.Coli estão baseados exatamente em interpretar os desvios deste comportamento, que tem sido observado para numerosas outras fosfatases alcalinas de diferentes origens.

Tentou-se também interpretar as curvas obtidas do "burst" do 2,4-dinitrofenol a diferentes valores de pH, com enzima do E.Coli, mas a equação diferencial obtida não pode ser simplificada para torná-la integrável e somente através de um tratamento aproximado da reação, resultou pelo menos um desvio da linearidade do plote de  $\pi$  versus concentração de enzima, na direção esperada.

É possível imobilizar esta enzima numa matriz celulose pela formação de grupos tionocarbamilos obtidos pela reação entre um éster xântico da celulose e um grupo amino livre proteína. Usou-se como modelo a reação de etilxantato de etilglicina, glicilglicina, glicinato de etila e ribonuclease.

Observou-se que o íon  $Zn^{++}$  forma complexo com etilxantato de etila em razão  $Zn : EXE > 1$ , dependendo do pH. Portanto seria preciso equilibrar com íons  $Zn^{++}$  o grupo xantato na celulose, ao pretender imobilizar a fosfatase alcalina pelo método mencionado para manter sua atividade.



### ABSTRACT

The mechanism of hydrolysis of phosphomonoesters catalyzed by alkaline phosphatase, in particular that from chicken intestine, through the monomer-dimer dissociation, was analyzed with respect to the need of the assumption of the reactivity of the monomer and also with respect to the differences with the Flip-Flop mechanism assuming that the reaction proceeds only through the dimer. The explanation of the autoinhibition and autoactivation at a constant enzyme concentration is valid with or without considering a reactive monomer. On the other side, the relationship between velocity and different total enzyme concentration at constant substrate concentration, can only be explained if the monomer is more reactive than the dimer.

The main difference between the mechanism assuming to go only through the dimer and the Flip-Flop mechanism, is that the latter must assume that some intermediates are not reactive, in order to obtain Michaelian kinetics. The monomer-dimer mechanism and others related with the enzyme from E.Coli are postulated exactly to interpret the deviations from this behavior that have been reported for a number of other phosphatases from different origins.

It was also tried to find an interpretation for the curves of the "burst" of 2,4-dinitrophenol at different values at different concentrations of the enzyme from E.Coli, but the differential equation obtained in the derivation cannot be integrated. Only an approximate approach to the mechanism made it possible to obtain a deviation (in the expected direction) of the plot of  $\Pi$  vs enzyme concentration.

It is possible to immobilize this enzyme on cellulose matrix using the reaction between a xanthic ester of cellulose with a free amino group of the protein, through thionocarbonyl groups. The reaction of ethyl ethylxanthate with glycine, glycylglycine, ethyl glycinate and ribonuclease were used as models.

It was found that  $\text{Zn}^{++}$  ion complexes with ethyl ethylxanthate in a ratio  $\text{Zn}^{++} : \text{EXE} > 1$ , depending on pH. Consequently, it would be necessary to pre-equilibrate the xanthate group on the cellulose with  $\text{Zn}^{++}$  ion when trying to immobilize the alkaline phosphatase by the above method, in order to maintain its activity.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Fosfatase Alcalina

Nos últimos anos, fosfatases alcalinas obtidas de diferentes fontes tem sido estudadas. No que se refere à purificação e características estruturais, os estudos se detiveram em poucas, entre as quais, Escherichia Coli,<sup>1</sup> intestino de terneiro,<sup>2</sup> placenta humana<sup>3</sup> e B. Licheniformis.<sup>4</sup>

A fosfatase alcalina de intestino de terneiro é uma glicoproteína, contendo em torno de 12% de amino-açúcares e carboidratos.<sup>5</sup>

A fosfatase alcalina do E.Coli tem uma estrutura quaternária composta de duas subunidades idênticas,<sup>6</sup> sendo que estas dissociam-se reversivelmente a baixo pH,<sup>7</sup> sob diluição<sup>8</sup> ou redução.<sup>9</sup>

Várias das fosfatases alcalinas tem mostrado serem enzimas zinco-metálicas. A fosfatase alcalina do E.Coli e a intestinal de terneiro apresentam a razão de quatro átomos de zinco por zima.<sup>5,10</sup> Dos quatro átomos-grama de zinco por mol de fosfatase alcalina do E.Coli, dois apresentam-se firmemente ligados à proteína aumentando a estabilidade da estrutura quaternária da molécula. Os dois outros parecem ser essenciais para a atividade da enzima.<sup>11</sup>

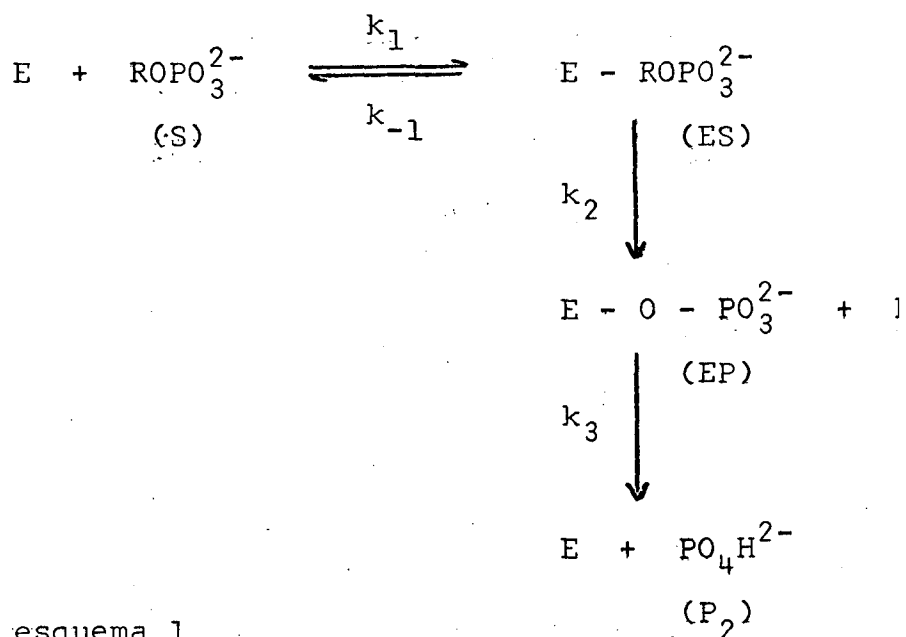
Fosfatase alcalina de intestino de frango tem sido pouco estudada, mas presentes dados sugerem que atuam semelhantemente às outras fosfatases.<sup>12,13</sup> O peso molecular desta fosfatase alcalina não podia ser determinado devido, provavelmente, à associação da enzima a carboidratos. Para fins de cálculo neste trabalho foi assumido, para a fosfatase alcalina intestinal de frango, o peso molecular igual a 150 000. Para enzima de intestino de terneiro o peso molecular é de 140 000.<sup>15</sup>

As enzimas citadas anteriormente segundo sua concentração podem apresentar auto-ativação ou auto-inibição, a concentração de substrato. Por exemplo, na hidrólise de 4-nitrofenilfosfato catalisado por fosfatase alcalina do E.Coli<sup>16</sup> ou de intestino de frango<sup>16</sup> foi observada uma auto-ativação.<sup>12</sup> Para a fosfatase alcalina intestinal de terneiro<sup>17,18</sup> o 4-metilumbelifenilfosfato

to apresenta uma auto-inibição à concentração alta do substrato. Alogamente comporta-se a enzima de intestino de rato na hidrólise  $\beta$ -gliceril fosfato.<sup>19</sup>

## 1.2. Cooperatividade negativa

Fundamentalmente o mecanismo de hidrólise de fomonoeésteres catalisada por fosfatase alcalina consiste num processo de duas etapas. Schwartz<sup>20</sup> e Engström<sup>21</sup> mostraram que o mecanismo enzimático envolve a formação de um complexo intermediário, qual o lugar crítico da fosforilação é um resíduo serina,<sup>22,24</sup> seguido por uma desfosforilação, segundo o esquema 1, onde E representa a enzima, S o substrato, ES o complexo não covalente formado o substrato e EP o intermediário covalente. A etapa seguinte à formação do complexo enzima-substrato (ES), ou seja, a etapa de fosforilação, temos a formação de um dos produtos ( $P_1$ ), que será um álcool ou fenol conforme o grupo R seja um alquil ou aril. Posteriormente EP se decompõe produzindo ortofosfato ( $P_2$ ) e regenerando a enzima.

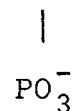


esquema 1

Estudos no equilíbrio, tem mostrado para a fosfatase alcalina do E.Coli e como substratos p-nitrofenilfosfato ( $^{32}\text{P}$ )pirofosfato a pH ácido, a absorção de dois moles de fosfato por mol de enzima,<sup>23</sup> sugerindo a existência de dois centros reativos na enzima. Entretanto para mesma enzima e substratos, sob condições de pH alcalino, foi observado a incorporação de apenas um fosfato por mol de enzima, ou seja, somente um grupo fosforilado.<sup>23</sup>

Nas proximidades do centro ativo diversos autores determinaram a sequência de aminoácido na qual produz, após a fosforilação, um grupo serina-fosfato. Para a fosfatase alcalina bacteriana, a estrutura mostra a seguinte sequência de aminoácidos:<sup>24,25</sup>

Thr-Gly-Lys-Pro-Asp-Tyr-Asp-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala



A pH 7,8 a força iônica alta ( $\mu = 1$ ) a enzima nativa do E.Coli liga-se com uma molécula de fosfato apresentando constante de dissociação igual a  $8 \times 10^{-6}$  M. Na interação de uma segunda molécula de fosfato, o valor mínimo da constante de dissociação foi calculado como sendo  $4 \times 10^{-3}$  M. A força iônica baixa ( $\mu = 0$ ), a constante de dissociação é de  $1,7 \times 10^{-5}$  e  $3 \times 10^{-4}$  M, respectivamente.<sup>25</sup>

Tem-se portanto, uma molécula de fosfato fortemente ligada, ocorrendo a saturação a baixa concentração de fosfato. Por outro lado, a saturação do segundo centro é mais dificultada sendo a molécula de fosfato fracamente unida, necessitando de altas concentrações de fosfato inorgânico.

Este comportamento é uma representação típica de cooperatividade negativa de uma primeira molécula em relação à ligação de uma segunda molécula de substrato.

### 1.3. Enzimas "half site"

Enzimas que apresentam uma forte cooperatividade negativa são classificadas como enzimas "half site", onde somente a metade das sub-unidades idênticas demonstram possuir reatividade. A origem deste comportamento pode ser devido, aos seguintes fatores:

- as sub-unidades são idênticas mas no dímero uma delas é deformada.
- os dois centros ativos são adjacentes e a primeira molécula de substrato bloqueia a segunda.
- uma mudança conformacional ocorrendo no segundo centro ativo após a ligação da primeira molécula de substrato.<sup>27</sup>

Como comentamos anteriormente, a fosfatase alcalina é constituída de duas sub-unidades. Estudos preliminares cristalográficos da enzima do E.Côli indicam que as duas sub-unidades, ausência de ligante, possuem conformação idêntica.<sup>26</sup> Entretanto, faixa de pH entre 7 e 9,5 a relação entre a fosforilação do centro ativo por mol de enzima é de um para um,<sup>23</sup> o que nos leva a classificar a fosfatase alcalina como enzima de "half site".

### 1.4. Objetivos

Um dos objetivos deste trabalho foi analisar a possibilidade de que o monômero da fosfatase alcalina seja reativo e a compatibilidade dos resultados obtidos através desta consideração e do mecanismo monômero-dímero com outros mecanismos propostos, especialmente o mecanismo Flip-Flop.

Outro objetivo foi tratar de interpretar os desvios da linearidade observados na cinética transiente com o modelo monômero-dímero.

Finalmente se tratou de obter resultados orientativos para a reação de grupos amínicos de aminoácidos, peptídeos e proteínas com ésteres xânticos, orientados a estudos de imobilização de enzimas utilizando a formação de monotionocarbamato.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Reagentes e equipamentos

Os produtos químicos usados para este trabalho foram de pureza analítica, sem purificações adicionais. A água para preparo das soluções foi primeiramente destilada, deionizada, quecida a 100°C durante 10 a 15 minutos e borbulhado nitrogênio até a temperatura ambiente.

O etilxantato de etila (EXE) utilizado foi preparado segundo procedimento clássico.<sup>28</sup>

Os reagentes glicina, glicilglicina e o glicinato de etila, o p-t-nitrofenilfosfato (p-t-BFF) foram obtidos Sigma Chemical Co. e o 4-nitrofenol (4-NF) da Merck, sendo utilizados sem qualquer purificação adicional. O p-t-butilfenilfosfato, sal de bário, foi sintetizado no Departamento de Química da Faculdade de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade do Chile, foi liberado do bário intercambiando-o numa resina Dowex 50-x (é da forte). As soluções estoques foram preparadas em soluções tampão a pH específico, permitindo assim no momento da diluição manter o valor de pH na mistura reacional. O mesmo procedimento foi empregado com albumina bovina e ribonuclease. Estes e as fosfatases alcalinas de frango e do E.Coli utilizados foram provenientes da Sigma Chemical Co.

As medidas cinéticas e espectros ultra-violeta foram realizados com um espectrofotômetro ultravioleta Spektrom Model 204, e um Hitachi-Perkin Elmer, Modelo 139.

Para as medidas de absorbância foram utilizadas células de quartzo de paredes duplas, com circulação de água termostaticada. A temperatura do banho controlou-se com um termômetro certificado, Schneider, calibrado em décimos de grau. A temperatura no termostato foi corrigida para obter nas células 25,0°C e 34,5°C.

O pH das soluções foi ajustado em um pHmetro Beck, Modelo 510, calibrado com soluções padronizadas.

Os computadores utilizados neste trabalho foram um Hewlett-Packard, Modelo 9810-A e um digital, Modelo pdp 11.

## 2.2. Métodos

### Otimizações

A primeira etapa do trabalho, foi otimizar os valores das constantes da expressão de velocidade no estado estacionário de um dado mecanismo, partindo-se de um conjunto de constantes inicial. Para determinadas concentrações de enzima total e substrato, variava-se somente um dos parâmetros do conjunto de constantes comparando-o com o valor obtido experimentalmente. Esta diferença então, analisava-se para cinco concentrações distintas de substrato considerando-se o melhor valor da constante para minimizar o somatório do módulo do resíduo, ou seja, o somatório da diferença entre os valores da velocidade calculada e experimental para diversas concentrações de substrato (apêndice 1). Para estudos na etapa transiente um outro programa foi empregado. Entretanto para obtermos uma curva que mais se aproximasse da curva experimental e não somente alguns pontos isolados, passou-se a determinar o resíduo quadrático médio, ou seja, o somatório do quadrado da razão entre a variação do valor calculado e experimental pelo valor experimental (apêndice 2).

O conjunto de constantes inicial foi obtido da referência 13 e os valores experimentais da velocidade em função da concentração de substrato para concentrações constantes de enzima total da referência 32. Para a etapa transiente os valores experimentais foram obtidos da referência 40.

Com a utilização de um computador digital pdp observou-se através de um osciloscópio, a variação das curvas do recíproco da velocidade versus o recíproco da concentração de substrato para concentrações altas e baixas de enzima e velocidade versus a concentração total de enzima. Estas curvas analisava-se simultaneamente, sendo os parâmetros das constantes variados individualmente e segundo a maior influência na equação da velocidade obtida a partir do mecanismo proposto (apêndice 3).

### Análise de fosfato

Para análise do ortofosfato foi seguido o método de Lowry-Lopez.<sup>29</sup> A curva de calibração foi obtida adicionando 4 ml de tampão acetato a pH 4 (0,1 N ácido acético, 0,025 N acetato de sódio), 1 ml de ácido ascórbico 1%, 1 ml de molibdato de amônia 1%, solução de fosfato a concentração conhecida e o volume completado a 10 ml. A absorbância foi medida a 700 nm após 5 e 10 minutos e extrapolada a tempo zero.

O sal de bário do fosfato tratou-se com resina intercambiadora de íons fortemente ácida. Considerando a pequena solubilidade em água, houve necessidade de agitar durante aproximadamente três horas para completar a dissolução.

Para determinação do fosfato orgânico fez-se reagir durante 12 horas, 2 ml deste com 1 ml de fosfatase alcalina de E.Coli 0,02 mg/ml, usando 0,2 M Tris (pH 8) como tampão. A concentração do fosfato orgânico obteve-se pela diferença entre a concentração do fosfato depois da hidrólise enzimática (fosfato inorgânico total) e aquela obtida antes desta reação.

### Atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática determinou-se baseado no seguinte método.<sup>30</sup> A 0,5 ml de Tris 0,2 M (pH 8) adicionou-se 1 ml de p-nitrofenilfosfato  $3 \times 10^{-3}$  M, 50 µl de fosfatase alcalina intestinal de frango 0,2 mg/ml e 1,45 ml de água. As leituras da absorbância em função do tempo foram medidas a 410 nm e 25 °C e tendo como referência água. Uma unidade de atividade definiu-se como sendo a variação de 0,001 unidade de absorbância por minuto. Como adicionamos 50 µl de enzima, o número de unidades é igual ao coeficiente angular  $\Delta A/\text{min}$  multiplicado por um fator igual a  $10^5$ .



TABELA I

Absortividade molar do EXE a diversas frações molares de álcool etílico em água.<sup>a</sup>

$X_{\text{EtOH}}$	$10^{-4} \epsilon$
0,04	1,08
0,07	1,13
0,158	1,23
0,434	1,18
0,645	1,15

a) A 25°C e  $\lambda = 283 \text{ nm}$

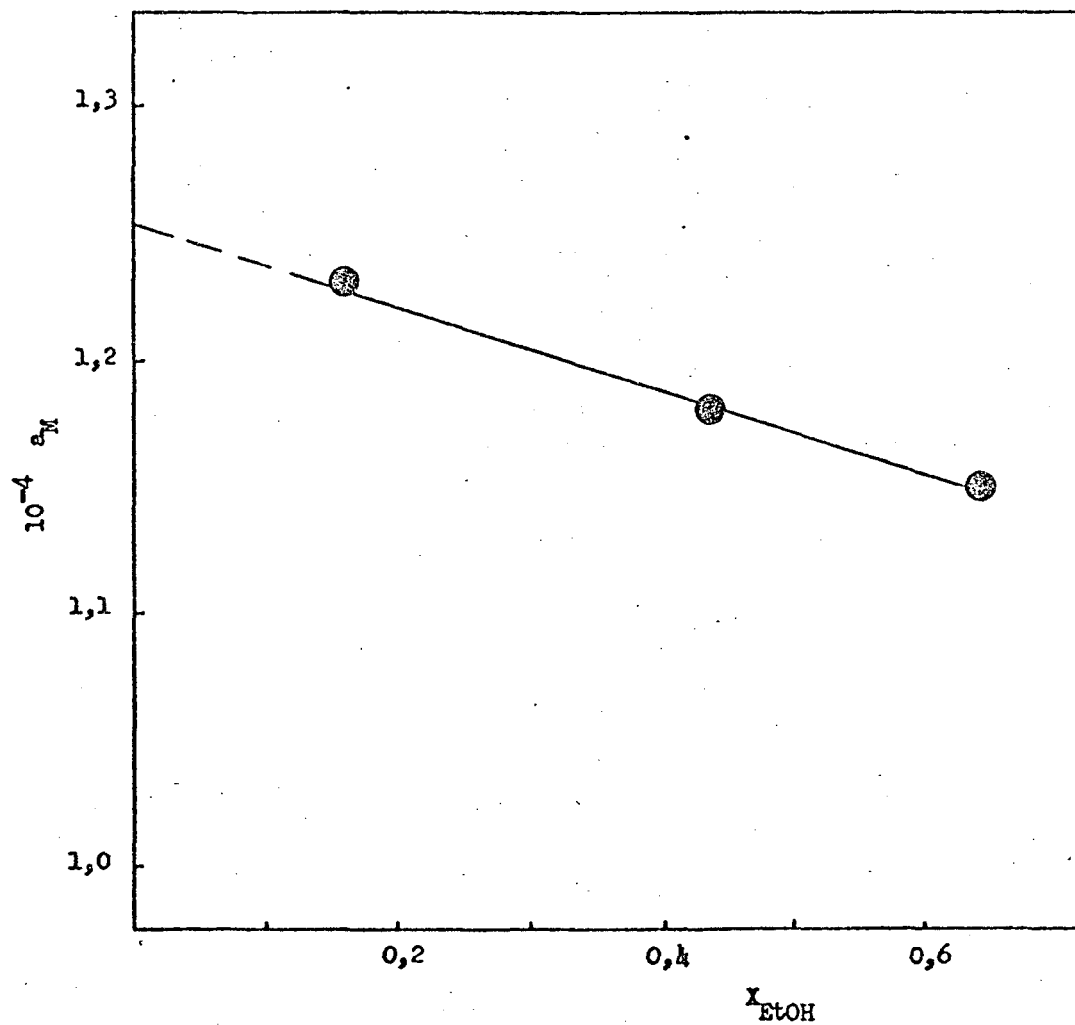


Figura 1:

Absortividade molar do EXE a diversas frações molares de álcool etílico em água.  $T = 25^{\circ}\text{C}$  e  $\lambda = 283 \text{ nm}$ .

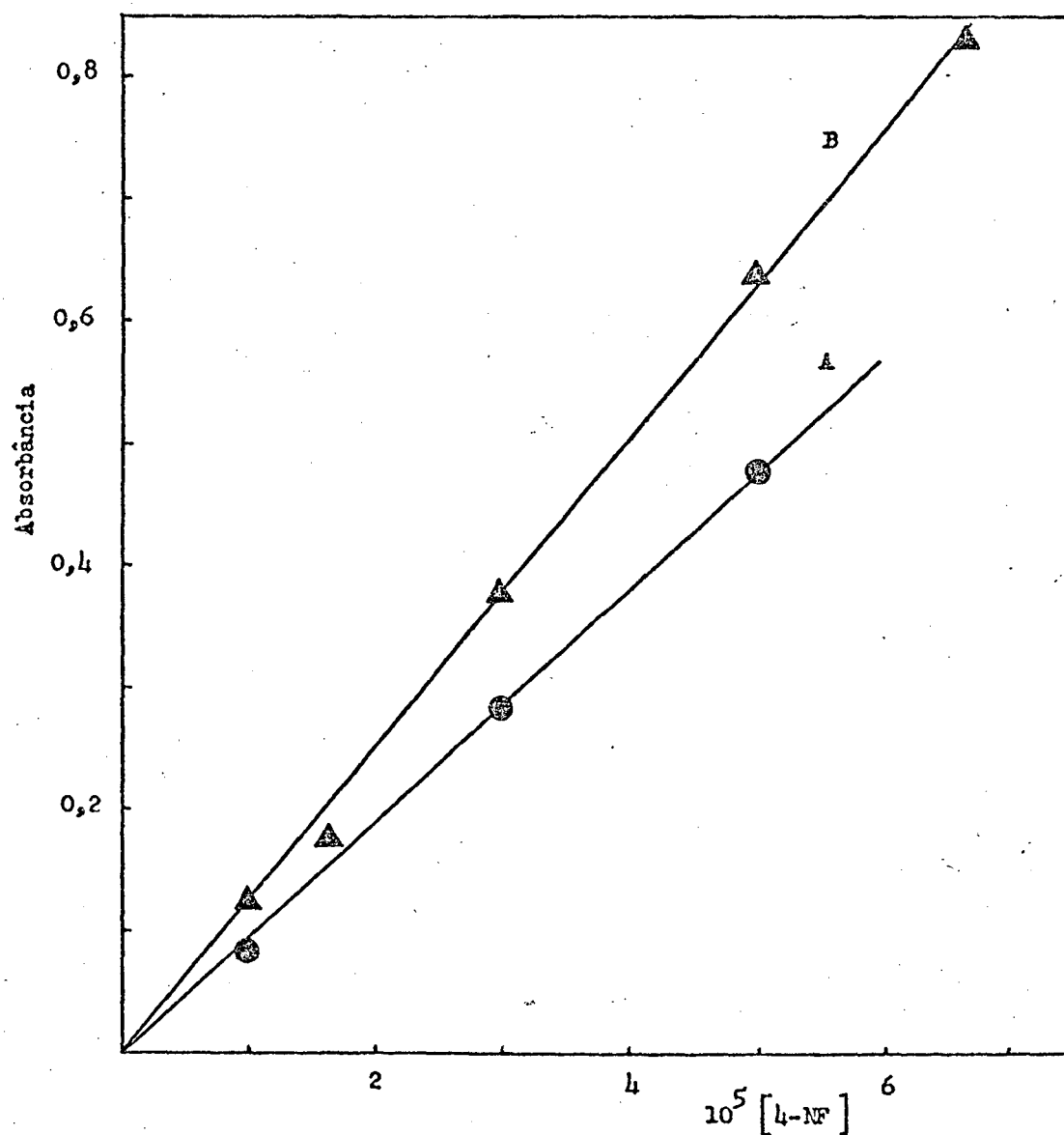


Figura 2:

Absortividade molar do 4-nitrofenolato a 25°C e 410 nm.

A - Determinação utilizando-se células de paredes duplas, Spektromon, Modelo 204.

B - Células de paredes simples, espectrofotometro UV-VIS, Hitachi-Perkin Elmer, Modelo 139.

#### Absortividade molar do EXE

A absortividade molar em soluções de etanol aquoso de EXE a 283 nm foi determinada pesando volumes variáveis de uma solução 10 mM de EXE em etanol e dissolvendo em quantidades pesadas de água e álcool etílico para dar volume total de 10 ml. Do plot de absorbância versus concentração de EXE, obtem-se a absortividade molar a diversas frações molares de álcool etílico utilizada. O valor correspondente à fração molar de álcool etílico aquoso nula foi extrapolado e determinado como igual a  $1,20 \times 10^4$ . (Figura 1, Tabela I).

#### Absortividade molar do 4-nitrofenolato (4-NF)

A absortividade molar do 4-nitrofenolato em água foi obtida a 410 nm e 25°C, tomando-se determinados volumes de 4-NF 0,5 mM e 0,5 ml de Tris 0,2 M a pH 8, sendo o volume completado a 3 ml com água. O valor da absortividade molar determinada no Spectrophotomom foi de  $9,5 \times 10^3$  enquanto o obtido no Hitachi-Perkin Elmer foi igual a  $1,2 \times 10^4$ . (na literatura a absortividade molar é de  $1,2 \times 10^4$ . <sup>31a,31b</sup>) (Figura 2). As medidas da atividade enzimática foram corrigidas segundo estas desviações.

#### Hidrólise enzimática do p-t-butilfenilfosfato

A hidrólise do p-t-BFF foi seguida cineticamente dissolvendo-se 2,3 ml de solução de p-t-BFF  $5,54 \times 10^{-3}$  M, 0,15 ml de Tris 0,2 M (pH 6,89), 0,3 ml de  $MgCl_2$  0,1 M e fosfatase alcalina de frango completando o volume a 3 ml com água. O volume de solução concentrada de enzima adicionado foi variado, de maneira que a concentração final variasse de  $2 \times 10^{-5}$  a  $10 \times 10^{-5}$ . Como referência foi tomada a mesma mistura reacional em ausência de fosfatase alcalina.

As variações de absorbância foram lineares em respeito ao tempo e seguidas durante quarenta minutos, a 283 nm

temperatura de 25,0°C utilizando-se como referência a mesma mistura reacional, sem a fosfatase alcalina de intestino de frango. A velocidade foi corrigida para 500 unidades de atividade da enzima. A atividade da enzima foi determinada imediatamente antes de cada série de corridas. A velocidade para determinada concentração de enzima total foi expressada em unidades de moles litro<sup>-1</sup>segundo<sup>-1</sup>. O valor para absorvidade molar do p-t-BFF foi tomado como 1016 a 283 nm, obtido num espectrofotometro automático, Gilford 2400.

#### Efeito do íon Zn<sup>++</sup> no espectro do EXE

A influência do íon zinco foi analisada adicionando-se solução de cloreto de zinco à solução de EXE em bicarbonato 10 mM (pH 10). Como o cloreto de zinco é um sal higroscópico, foi necessário titular o cloreto pelo método de Mohr, com nitrato de prata e cromato de potássio.

Os espectros de absorção no ultra-violeta da solução de EXE  $4,3 \times 10^{-5}$  M e em presença de  $ZnCl_2$  com concentração final de  $3,43 \times 10^{-4}$  M, é apresentado na Figura 3.

A variação de absorbância, a 260 nm de uma solução de EXE em bicarbonato de sódio 10 mM a pH 10, foi observada com quantidades crescentes de cloreto de zinco (Figura 4).

#### Aminólise do EXE

Em ensaios preliminares, no acompanhamento da aminólise do EXE, em presença de albumina bovina de soro (ABS), foram tomados espectros de absorção ultra-violeta a tempo zero após quinze horas, das misturas reacionais e das amostras contendo somente EXE nas mesmas condições. A solução de ABS (peso molecular de 69 000) continha 6,36 mg/ml e 1 ml foi adicionado a 50 µl de solução saturada de EXE a pH 10 em  $NaHCO_3$  10 mM, completando-se o volume de 3 ml com solução do mesmo tampão.

Medidas cinéticas foram determinadas a 25°C com ribonuclease (peso molecular 13 500), glicina e glicilglicina, todas preparadas em solução 0,03 M  $NaHCO_3$  e 0,03 M NaOH (pH

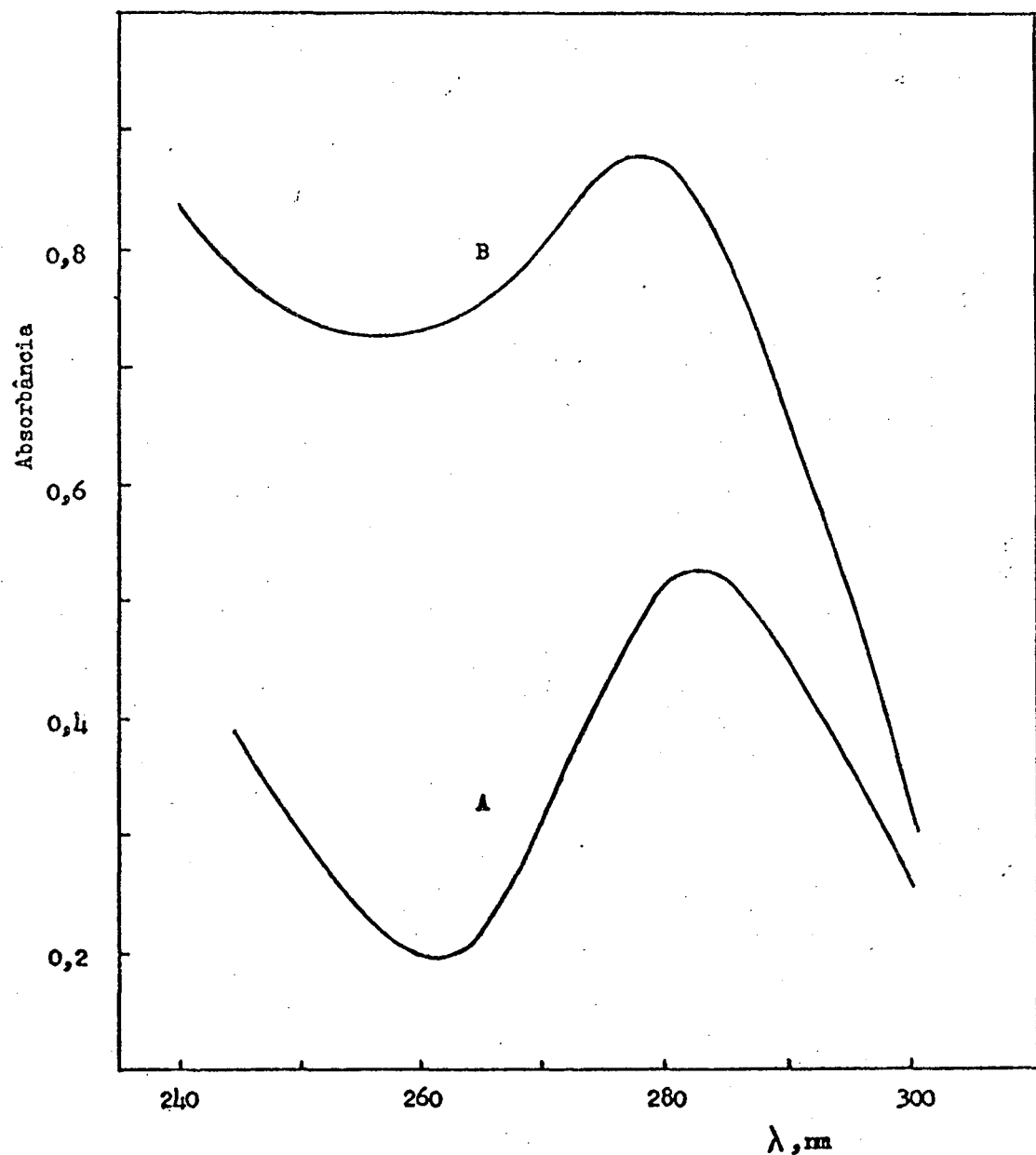


Figura 3:

Espectro ultra-violeta do EXE em solução aquosa.

- A - EXE ( $4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) em  $\text{NaHCO}_3$  10 mM a pH 10.  
B - EXE ( $4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ),  $\text{ZnCl}_2$  ( $3,43 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) em  $\text{NaHCO}_3$  10 mM a pH 10.

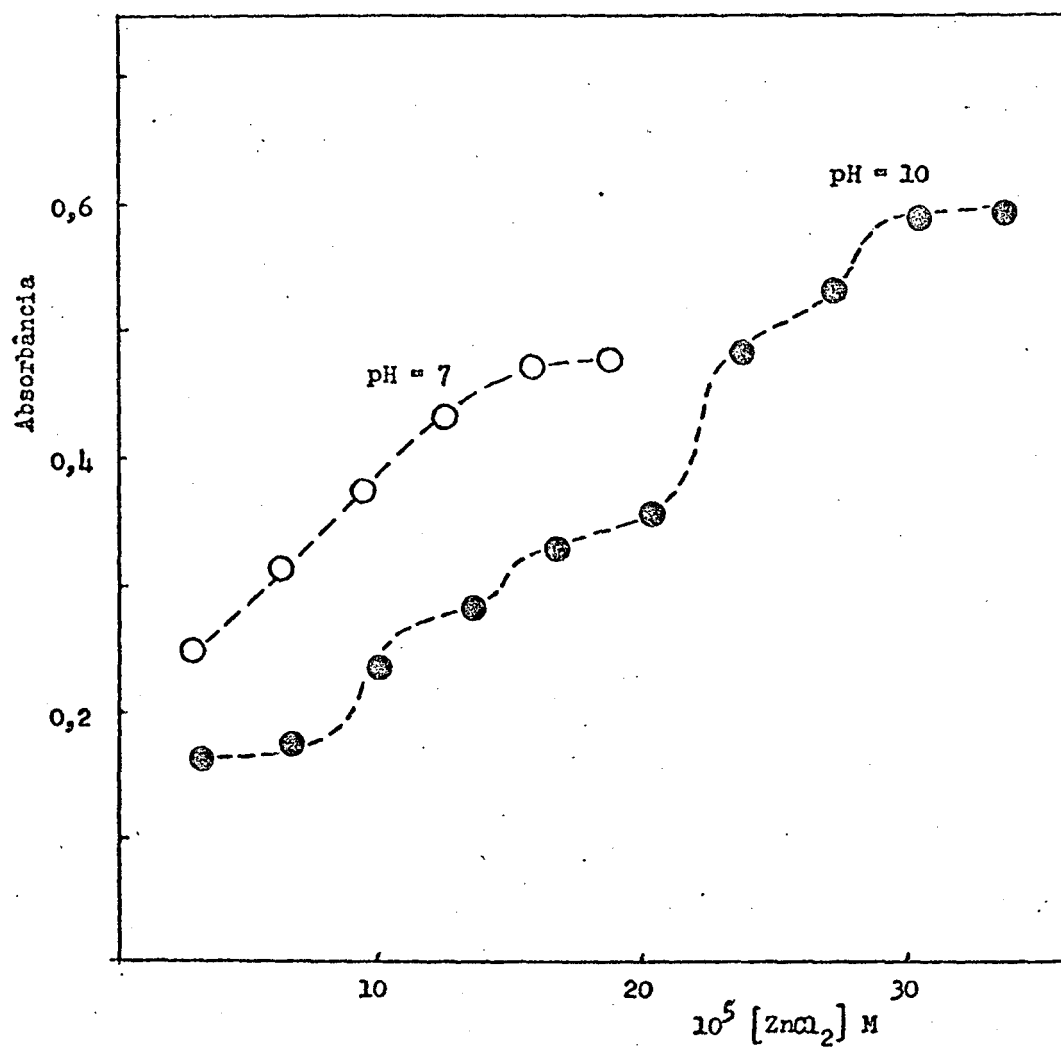


Figura 4:

Variação de absorbância, a 260 nm, versus concentração de cloreto de zinco adicionado a uma solução aquosa de EXE em  $\text{NaHCO}_3$  10 mM e  $T = 18,6^\circ\text{C}$ .

A variação de absorbância lida a 283 nm para mistura reacional EXE, nas mesmas condições, foram acompanhadas durante quinze hor

O EXE possui absorbância máxima a 283 nm, enquanto o monotionocarbamato formado apresenta a 242 nm. No acompanhamento destas reações foram tomadas medidas da variação da absorbância durante duas vidas médias e a tempo infinito. Tais medidas são denominadas medidas cinéticas, uma vez que nos permitirão determinar a constante observada. Nas medidas não cinéticas preocupa-nos somente a observação da reatividade, sendo portanto as medidas de absorbância tomadas somente a tempo zero e infinito.

A concentração de EXE utilizada nas medidas cinéticas foi inferior à concentração de aminoácido, dipeptídeo ou proteína empregados, sendo a reação de pseudo-primeira ordem em relação ao EXE.

Ao adicionarmos volumes iguais de solução saturada de EXE obtinhamos leituras distintas da absorbância inicial. Para evitar esta variação, adicionou-se um pequeno volume de álcool etílico à solução saturada de EXE, para solubilização da microprecipitação, resultando valores reprodutíveis da absorbância para determinadas concentrações.



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Otimização das constantes do mecanismo monômero-dímero.

O mecanismo monômero-dímero,<sup>30</sup> é apresentado no esquema 2. Denotamos por  $E_2$  a enzima na forma dímera e por  $E$  a enzima na forma monomérica. Este mecanismo postula que a enzima, em forma dímera, dissocia-se reversivelmente em monômero e ambas as formas são reativas.  $K_d$  é a constante de dissociação da enzima e  $K'$ ,  $K_1'$ ,  $K''$  e  $K'''$  referem-se às constantes de dissociação dos intermediários enzima-substrato. As constantes catalíticas de primeira ordem para os intermediários  $ES$ ,  $E_2S$  e  $E_2S_2$  são representados por  $k_1'$ ,  $k_2''$  e  $k_2'''$ .

A concentrações altas de substrato uma segunda molécula une-se à enzima na forma monomérica, formando o intermediário  $ES_2$  inativo e a forma dímera formando o intermediário  $E_2S_2$  que é reativo. No primeiro caso se produz uma auto-inibição e no segundo uma auto-ativação, porque  $E_2S_2$  seria mais reativo que  $E_2S$ .

Para relacionarmos os valores de velocidade experimentais e teóricos, a partir do mecanismo monômero-dímero há necessidade de estimarmos os valores das constantes de equilíbrio e catalíticas. Inicialmente foram obtidos otimizando-se os valores experimentais de algumas enzima similares, supondo o monômero reativo (Tabela II).

A expressão da velocidade (1) pode ser escrita como função da concentração da enzima na forma monomérica da concentração do substrato (2).

$$v = k_1' ES + k_2'' E_2S + k_2''' E_2S_2 \quad (1)$$

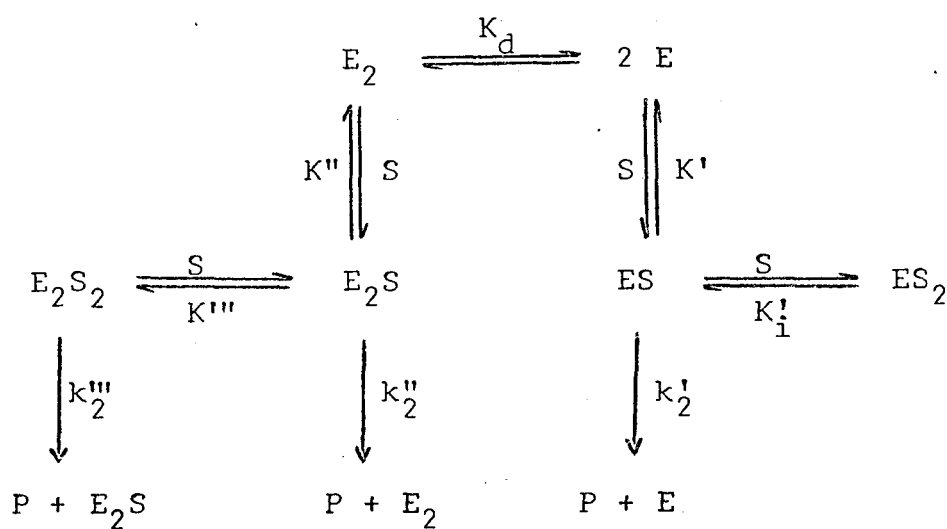
$$v = \frac{k_1'}{K'} S.E + \frac{k_2''}{K_d K''} S.E^2 + \frac{k_2'''}{K_d K'' K'''} S^2.E^2 \quad (2)$$

A concentração de enzima expressada como monômero é função da concentração total de enzima (4) e (5);

$$E_{2t} = E_2 + 1/2 E + 1/2 ES + ES_2 + E_2S + E_2S_2 \quad (4)$$

Onde as espécies  $E$ ,  $E_2$ ,  $ES$ ,  $E_2S$ ,  $E_2S_2$ ,  $E_2S_2S$ , etc. representam concentrações em moles/litro.

Mecanismo Monômero-dímero  
Estado Estacionário



esquema 2

$$E_{2t} = \frac{E}{2} \left[ 1 + \frac{S}{K'} + \frac{S^2}{K' K'_i} \right] + \frac{E^2}{K_d} \left[ 1 + \frac{S}{K''} + \frac{S^2}{K'' K'''} \right] \quad (5)$$

Sejam A e B definidos por (6) e (7)

$$A = \frac{1}{K_d} \left[ 1 + \frac{S}{K''} + \frac{S^2}{K'' K'''} \right] \quad (6)$$

$$B = \frac{1}{2} \left[ 1 + \frac{S}{K'} + \frac{S^2}{K' K'_i} \right] \quad (7)$$

Obtém-se uma equação do segundo grau, cuja solução fornece (8),

$$E = \frac{1}{2} \left[ \sqrt{\left( \frac{B}{A} \right)^2 + \frac{4 E_{2t}}{A}} - \frac{B}{A} \right] \quad (8)$$

Portanto, com uma concentração total de enzima e de substrato, para o conjunto de constantes estimadas,<sup>13</sup> terminou-se a velocidade através da equação (2), obtendo uma coincidência entre os valores calculados e os experimentais.

Testamos então a possibilidade de poder obter resultados similares supondo a não reatividade do monômero, comparando-se o valor da velocidade calculada com o valor experimental para as mesmas condições de reação e concentrações de substrato e enzima total. O procedimento foi repetido, variando uma das constantes, até obtermos um valor mínimo do somatório do dulo da diferença entre a velocidade calculada e experimental. Analogamente, com o novo valor de uma determinada constante, seguimos o mesmo procedimento, obtendo valores apresentados na tabela II (ver apêndice 1).

Plotando-se o inverso da concentração do substrato versus inverso das velocidades calculadas, supondo o monômero reativo ou não reativo, a uma concentração de fosfatase calina intestinal de frango constante, notamos a semelhança das curvas obtidas nos dois casos. Nessas condições, a uma concentração baixa de enzima, tal como  $8,33 \times 10^{-10}$  M (Figura 5 B) ao crescer a concentração do substrato p-t-BFF de  $4 \times 10^{-4}$  M

$1,4 \times 10^{-4}$  M, ou seja, antes de alcançar o mínimo no plote, o decréscimo da concentração aumenta a velocidade. Entretanto, para concentrações inferiores de substrato observa-se o inverso. maior concentração de enzima, como  $2,22 \times 10^{-8}$  M (Figura 5 A), medida que aumentamos a concentração de substrato a velocidade aumenta mais rapidamente, ou seja, desvia-se da linearidade quando a concentração deste é alta.

Portanto, o modelo monômero-dímero permite a determinação dos valores das constantes e fornece curvas calculadas nas quais as formas aproxima-se das curvas experimentais de velocidades para concentrações variáveis de substrato e de enzima tal constante. Entretanto, somente a análise a concentração constante de enzima não é suficiente para obtenção de dados conclusivos quanto à reatividade ou não reatividade do monômero.

### 3.2. Hidrólise enzimática do p-t-BFF

A velocidade de hidrólise a concentração constante de p-t-BFF a diferentes concentrações totais de fosfatas alcalina intestinal de frango, foi determinada a pH 6,89 e  $25^{\circ}$

Os valores obtidos mostram a mesma tendência dos observados em outros trabalhos.<sup>32</sup> (Tabela III, Figura 6).

A baixas concentrações de enzima a tangente da curva concentração de enzima total versus velocidade é maior que a concentrações altas. Tal comportamento é consistente com hipótese não só de que o monômero é reativo, mas que ele é mais reativo do que o dímero, como foi sugerido para a enzima do E. coli.<sup>8</sup> Qualitativamente pode-se pensar que à medida que a concentração de enzima aumenta, a fração de monômero é menor e portanto sendo a curvatura côncava o monômero deveria ser mais reativo do que o dímero.

Com os valores do conjunto de constantes obtidas em condições similares (Tabela II), supondo  $k_2'$  diferente zero, pode-se obter a curva de velocidade versus concentração enzima total para uma determinada concentração de substrato, segundo esquema 2. Na figura 6 a curva pontilhada indica estes resultados, para concentração de p-t-BFF igual a  $4,25 \times 10^{-3}$  M. Como era de se esperar, a curvatura não corresponde à obtida experimentalmente, visto que no referido conjunto de constantes

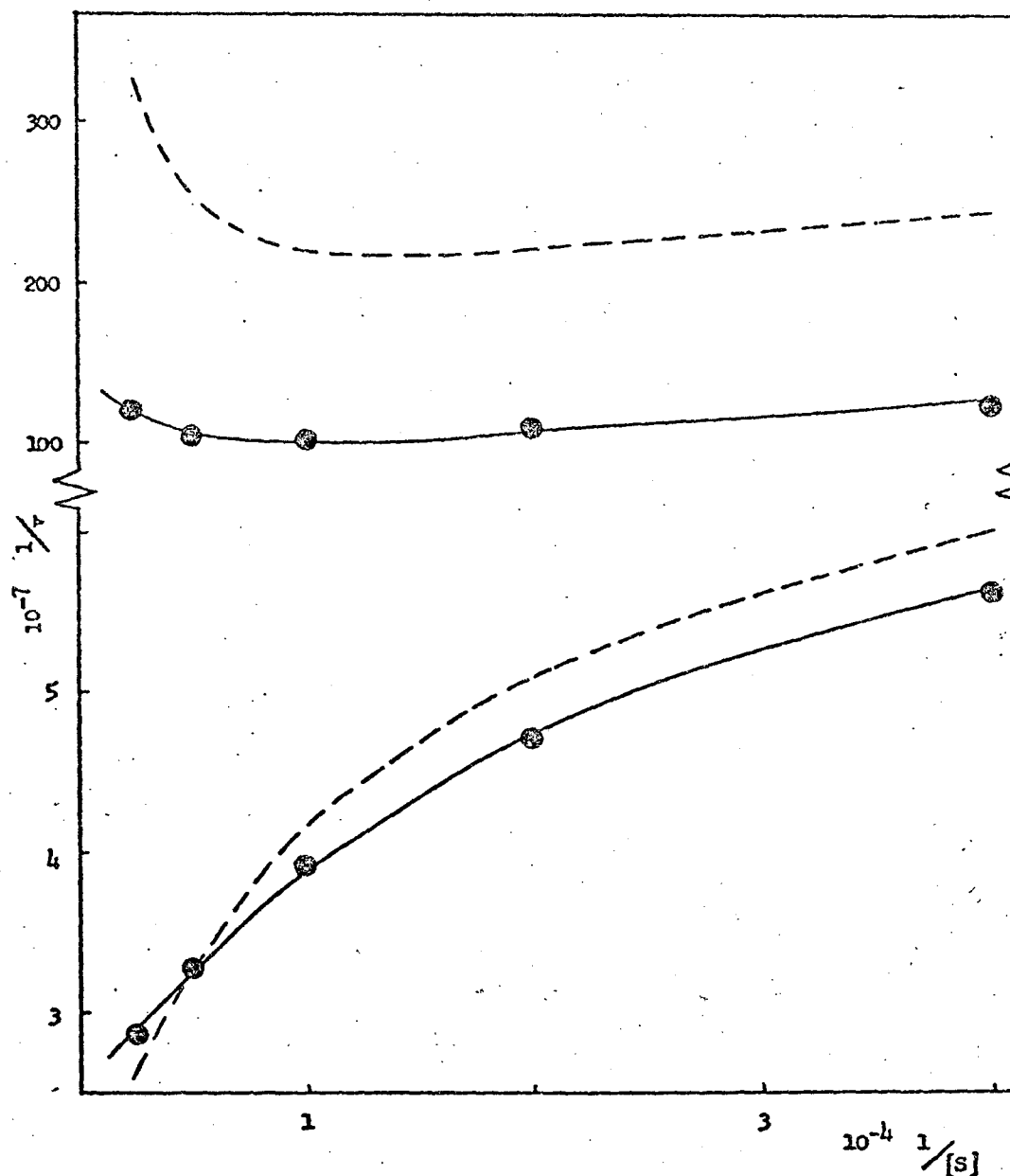


Figura 5:

Gráfico de Linewaver-Burk para a hidrólise do p-t-BFF a pH 6,89,  $T = 25^{\circ}\text{C}$ , Tris 0,01 M e  $\text{MgCl}_2$  0,01 M. ● valores experimentais. --- curva calculada com o conjunto de constantes otimizado, supondo o número não reativo (Tabela II). A e B indicam a concentração alta e baixa de enzima respectivamente.

TABELA II

Otimização das constantes da hidrólise do p-t-butil  
fenilfosfato e p-t-amilfenilfosfato catalisada por  
fosfatase alcalina intestinal de frango.<sup>a</sup>

	p-t-BFF			
	valor não <sup>b</sup> otimizado	valor <sup>c</sup> otimizado	valor não otimizado	valor otimizado
$K_d$	$0,5 \cdot 10^{-9}$	$0,57 \cdot 10^{-9}$	$0,5 \cdot 10^{-9}$	$0,86 \cdot 10^{-9}$
$K'$	$3,96 \cdot 10^{-6}$	$10,4 \cdot 10^{-6}$	$0,42 \cdot 10^{-5}$	$6,1 \cdot 10^{-5}$
$K''$	$3,49 \cdot 10^{-6}$	$(3,49 \cdot 10^{-6})$	$1,63 \cdot 10^{-4}$	$(1,63 \cdot 10^{-4})$
$K'_1$	$1,09 \cdot 10^{-3}$	$0,61 \cdot 10^{-3}$	$0,15 \cdot 10^{-2}$	$0,15 \cdot 10^{-2}$
$K'''$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$(1,2 \cdot 10^{-2})$	$0,14 \cdot 10^{-2}$	$(0,14 \cdot 10^{-1})$
$k'_2$	0,67	zero	0,54	zero
$k''_2$	0,72	(0,72)	0,77	(0,77)
$k'''_2$	55	(55)	55	(55)

a) Condições de reação, pH = 6,89, t = 25,0°C, Tris 0,01 M  
MgCl<sub>2</sub> 0,01 M, concentração total de enzima de  $1,25 \times 10^{-4}$   
 $3,33 \times 10^{-4}$  M. Os valores entre parenteses foram mantidos  
constantes em ambas as condições.

b) Valores otimizados considerando o monômero reativo (ref. 1)

c) A ordem de ajuste das constantes foi  $K'$ ,  $K'_1$  e  $K_d$  considera-  
do-se a não reatividade do monômero ( $k'_2 = 0$ ).

ram assumidas ambas as formas da enzima com aproximadamente u constante catalítica da mesma ordem de grandeza.

Passamos portanto a procurar outro conjun de constantes que satisfizesse a semelhança entre as curvas o tidas experimentalmente e calculadas.

A partir das equações (2), (6), (7) e (8) o têm-se a equação (9), definindo-se a relação entre as constan tes para fins de facilitar a determinação dos parâmetros, de G, C, I, H, M e N segundo as expressões (10), (11), (12), (13 (14), (15) e (16) respectivamente.

$$v = - \frac{k_2' S B}{2K' A} + \frac{k_2' S}{2K'} \sqrt{\frac{B^2}{A^2} + \frac{4 E_{2t}}{A}} + \left( \frac{k_2'' S}{K_d K''} + \frac{k_2 S}{K_d K'' K'''} \right) \times$$

$$\times \left[ \frac{B^2}{4A^2} + \frac{E_{2t}}{A} - \frac{B}{2A} \sqrt{\frac{B^2}{A^2} + \frac{4 E_{2t}}{A}} + \frac{B^2}{4A^2} \right] \quad (9)$$

$$X = \frac{k_2' S}{K_d K''} + \frac{k_2''' S^2}{K_d K'' K'''} \quad (10)$$

$$G = \frac{k_2'' S}{2 K'} \quad (11)$$

$$C = G - \frac{B X}{2 A} \quad (12)$$

$$I = \frac{X B^2}{2 A^2} - \frac{G B}{A} \quad (13)$$

$$H = \frac{X}{A} \quad (14)$$

$$M = \frac{4 A}{B^2} \quad (15)$$

$$N = \frac{C B}{A} \quad (16)$$

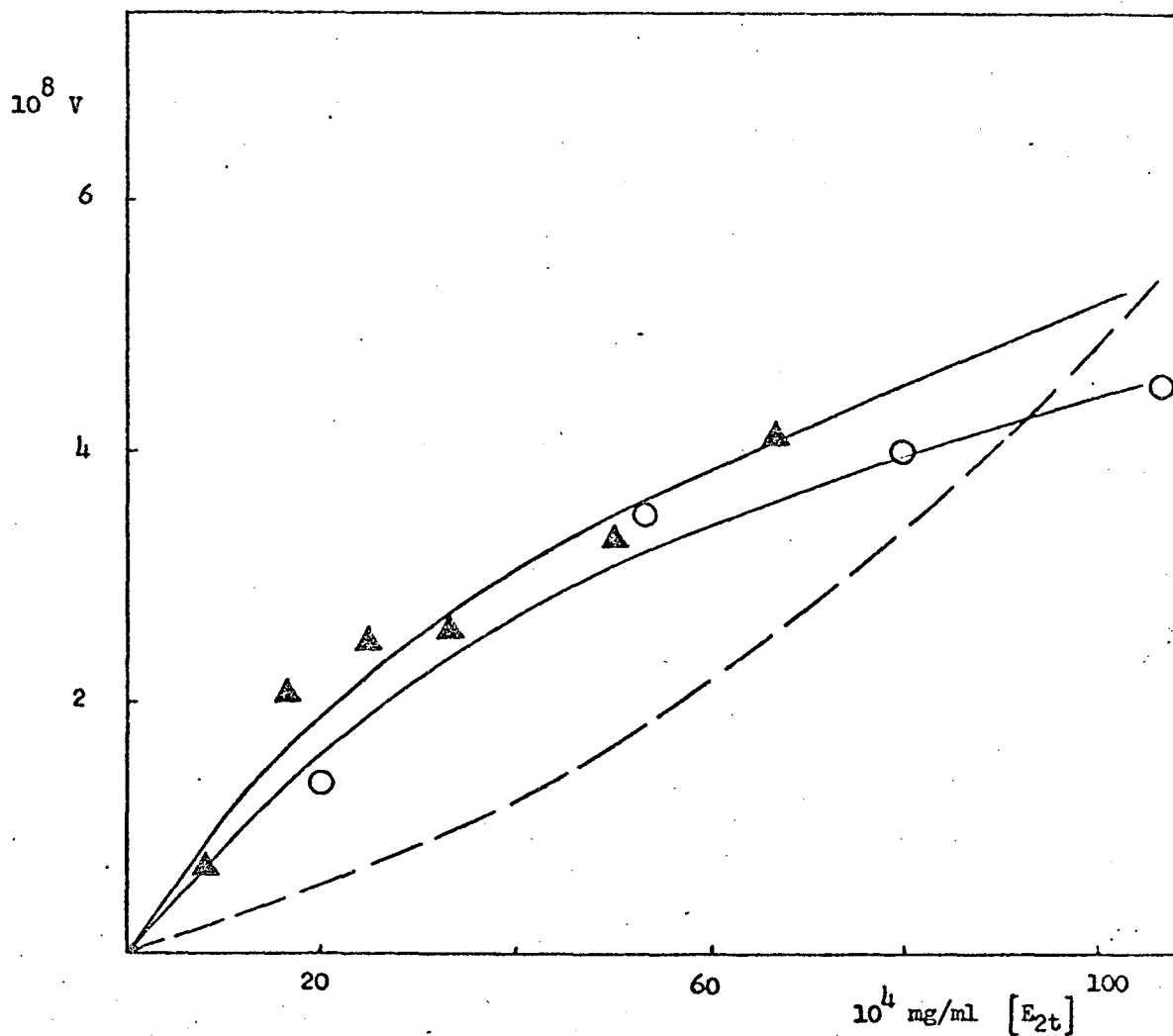


Figura 6:

Hidrólise do p-t-BFF a concentrações variáveis de fosfatase alcalina intestinal de frango, a pH 6,89 em Tris 0,01 M e  $\text{MgCl}_2$ .

[p-t-BFF] ○  $4,25 \times 10^{-3} \text{ M}$  ▲  $1,41 \times 10^{-3} \text{ M}$

A velocidade foi corrigida para 500 unidades de enzima (referência 32). A curva tracejada corresponde a velocidade calculada, para o conjunto de constantes apresentada na Tabela II, considerando o monômero reativo.



TABELA III

Dependência da hidrólise do p-t-BFF com a concentração total de fosfatase alcalina intestinal de frango.<sup>a</sup>

$10^4$ Enzima <sup>b</sup>	$10^8$ v <sup>c</sup>
8,33	(0,69) <sup>d</sup>
20,00	1,36
16,60	(2,10)
24,99	(2,50)
33,32	(2,51)
49,98	(3,30)
53,33	3,51
66,64	(4,13)
80,00	3,99
106,70	4,53
166,70	4,60

a) A pH 6,89, Tris 0,01 M,  $MgCl_2$  0,01 M,  $\lambda = 283$  nm.

b) Concentração da enzima em mg/ml. A atividade padrão da enzima foi de 222 unidades, p-t-BFF =  $4,25 \times 10^{-3}$  M.

c) Em moles litro<sup>-1</sup>segundo<sup>-1</sup>. Os valores da velocidade foram corrigidos para 500 unidades de atividade da enzima.

d) Os valores entre parenteses foram obtidos da referência 32. Atividade padrão da enzima 328 unidades [p-tBFF] =  $1,41 \times 10^{-3}$  M.

A equação (9), tornar-se-á;

$$v = \frac{C B}{A} \sqrt{1 + \frac{4 A E_{2t}}{B^2}} + \frac{X}{A} E_{2t} + I \quad (17)$$

Quando a concentração total de fosfatase alcalina intestinal é igual a zero, para que a velocidade seja nula I deve ser igual a  $-CD/A$  e a equação (17) pode ser reescrita como a equação (18).

$$v = N (\sqrt{1 + M E_{2t}} - 1) + H E_{2t} \quad (18)$$

Partindo-se do conjunto de valores das constantes estimadas (Tabela II), determinamos os valores de N, M e H com a utilização do computador, otimizando-os em relação aos pontos obtidos experimentalmente (Tabela III). Este procedimento foi efetuado para concentração de p-tBFF igual a  $1,41 \times 10^{-3}$  e  $4,25 \times 10^{-3}$  M, resultando os valores abaixo relacionados. (Figura 5). Mesmo sendo os parâmetros N e H dependentes da concentração de enzima, para as concentrações utilizadas a variação torna-se desprezível em relação a M.

$10^3$ S	$10^{-8}$ M	$10^8$ N	$10^2$ H
1,41	3,0	1,44	4,7
4,25	2,3	1,44	4,7

Mantendo-se o parâmetro da constante A fixo determinado a partir do conjunto inicial (Tabela II) e com os valores de M, N e H determinamos as demais constantes B, C, X e Da expressão de G, obtemos a razão  $k_2'/K'$  como igual a  $1,68 \times 10^{-3}$ . Entretanto considerando o fato de que ao mantermos fixo o valor de A, que relaciona a concentração de substrato e constantes na equação 61, implicaria na fixação de diversas constantes em relação aos valores iniciais (Tabela II), passamos a utilizar ou

técnica. Tomando-se a partir das equações (6), (7) e (10) o plot de  $(A K_d - 1)/S$  versus  $S$ ,  $(B - 1)/S$  versus  $S$  e  $X/S$  versus  $S$  assumindo conhecida a constante de dissociação  $K_d$ , através dos coeficientes angular e linear de cada reta estimamos o valor do conjunto de constantes. Os valores obtidos encontram-se na Tabela IV, conjunto IV.

O aumento da constante catalítica  $k_2'$  e a considerável diminuição da constante catalítica  $k_2''$  (Tabela IV, conjuntos I e IV) são coerentes com a hipótese de que o monômero seja mais reativo do que o dímero. Entretanto, para baixa concentração de enzima total, a auto-inibição a concentração alta de substrato não é observada (Figura 7). Tal fenômeno ocorre com uma diminuição de duzentas vezes da constante de dissociação do intermediário  $ES_2$  (Tabela IV, conjunto V). Uma diminuição de mil vezes torna a auto-inibição mais evidente, em prejuízo da forma da curva de concentração total de enzima versus velocidade de hidrólise do p-t-BFF (Figura 7, Tabela IV conjunto VI).

Portanto, o melhor conjunto de constantes que satisfaz simultaneamente as curvas do inverso da concentração de substrato versus inverso da velocidade para alta e baixa concentração de enzima, como para concentração de enzima total versus velocidade é o conjunto V, apresentado na Tabela IV.

Um outro procedimento foi tentado, simplificando-se o modelo monômero-dímero, desconsiderando-se as etapas de auto-ativação da parte dímera e auto-inibição da monomérica reduzindo a expressão de velocidade segundo a equação (19). Essa suposição seria válida somente quando a concentração de substrato for suficientemente baixa, de maneira que não apresente auto-inibição ou auto-ativação.

$$v = \frac{k_2'}{K'} E S + \frac{k_2'' E^2 S}{K'' K_d} \quad (19)$$

Para valores constantes da concentração de substrato e da constante de dissociação enzima-substrato, obtivemos os parâmetros da equação (19), sendo a ordem de grandeza da velocidade calculada de  $10^{-4}$ . Comparando as equações (19) e (2) temos  $k_2'/K' = 1000$  e  $k_2''/K'' = 12$ . Com a utilização de um computador digital e de um osciloscópio, passamos a otimizar as const

Figura 7:

Gráficos das curvas calculadas segundo o conjunto de constantes otimizadas.

Coluna A: velocidade versus concentração total enzima.

Coluna B: inverso da velocidade versus inverso concentração de substrato.

Coluna C: inverso da velocidade versus inverso concentração de substrato.

Os conjuntos de constantes representados pelos algarismos romanos estão especificados na Tabela IV.

As unidades da velocidade, concentração de enzima e substrato são  $\text{moles litro}^{-1} \text{seg}^{-1}$ ,  $\text{mg/ml}$  e  $\text{mol litro}^{-1}$  respectivamente.

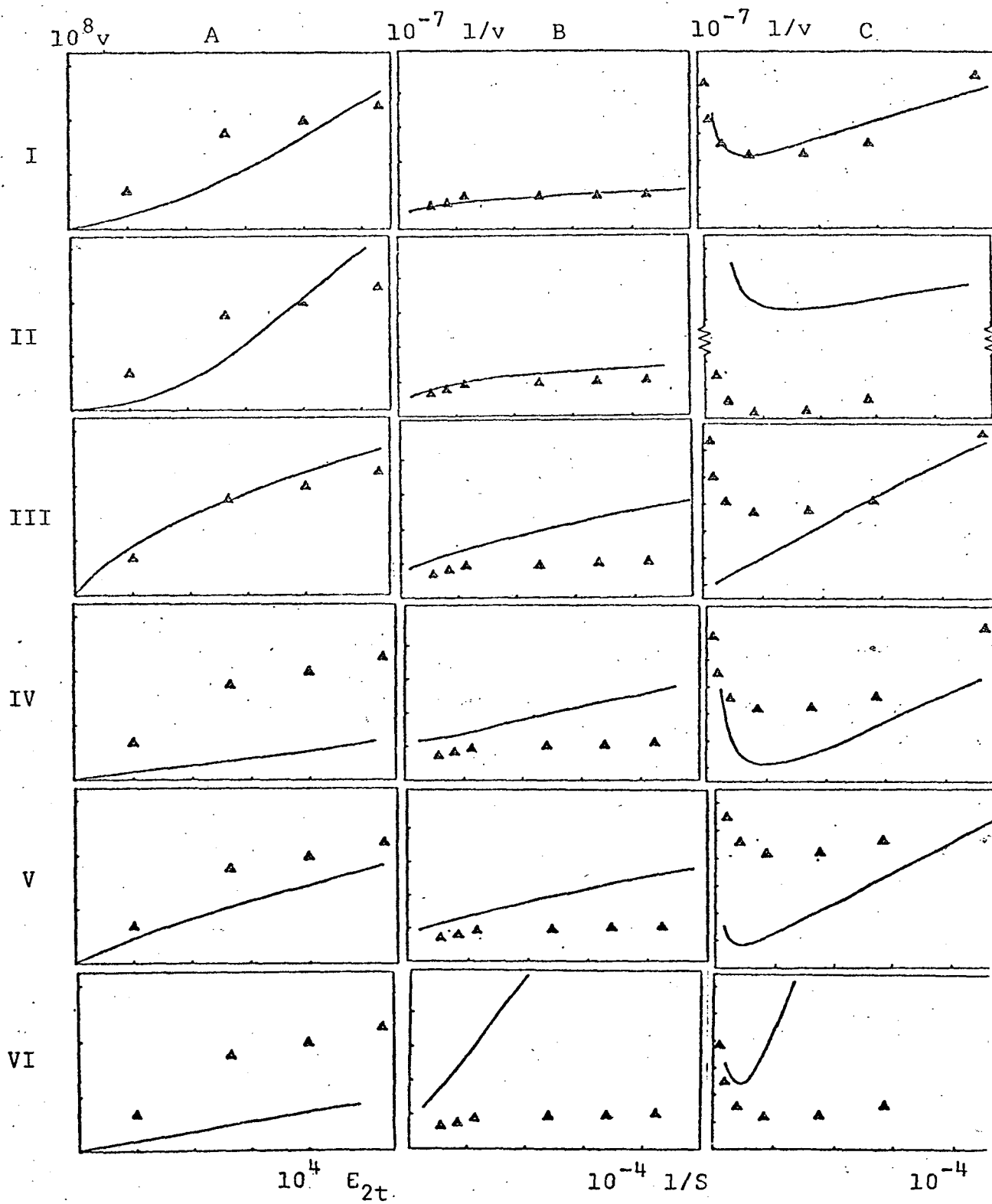


TABELA IV

Conjunto otimizado de constantes de dissociação e catalítica do mecanismo monômero-dímero. <sup>a</sup>

Conj	$10^9 K_d$	$10^3 K_i$	$10^4 K''$	$10^6 K'$	$10^6 K''$	$10^2 K'_2$	$10^2 K''_2$	$10^2 K''_2$
I	0,50	1,09	120,00	3,96	3,49	67	72	5500
II	0,57	0,61	120,00	10,40	3,49	zero	72	5500
III	0,50	1,09	120,00	25,00	5,50	67	72	5500
IV	0,50	430,00	3,33	6,56	14,30	110	3,58	0,16
V	0,50	2,15	3,33	6,56	14,30	110	3,58	0,16
VI	0,50	0,43	3,33	6,56	14,30	110	3,58	0,16

a) ver Figura 7.

tes.

$$v = 4 \times 10^4 E + 500 E^2 \quad (20)$$

Dos valores não otimizados da Tabela II, houve necessidade de alterarmos  $K'$  para  $2,5 \times 10^{-5}$  e  $K''$  para 5,5 (Tabela IV, conjunto III) (anexo 3).

Ao analisarmos a não reatividade do monômero para a variação da velocidade em função da concentração de fosfatase alcalina, a expressão da velocidade ficou reduzida a equação (21).

$$v = C E^2 \quad (21)$$

onde

$$C = \frac{k_2'' S}{K'' K_d} + \frac{k_2''' S^2}{K''' K'' K_d} \quad (22)$$

sendo a expressão da velocidade dada por;

$$v = \frac{C}{4} \left[ 2 \frac{B^2}{A^2} + \frac{4 E_{2t}}{A} - \frac{2B}{A} \sqrt{\frac{B^2}{A^2} + \frac{4 E_{2t}}{A}} \right] \quad (23)$$

Da equação (23), (onde A, B e C são maiores do que zero) notamos que um aumento da concentração total de enzima aumenta a velocidade. Este aumento cresce com o aumento da concentração total de enzima, pois o termo da subtração não cresce proporcionalmente. Portanto não é possível obtermos uma curva que se aproxime da forma da curva obtida experimentalmente, para qualquer conjunto de constantes, considerando a não reatividade do monômero, pois uma variação das constantes altera apenas os parâmetros da expressão, não interferindo na relação anteriormente descrita.

### 3.3. Correlação entre os mecanismos Flip-Flop e Monômero-dímero

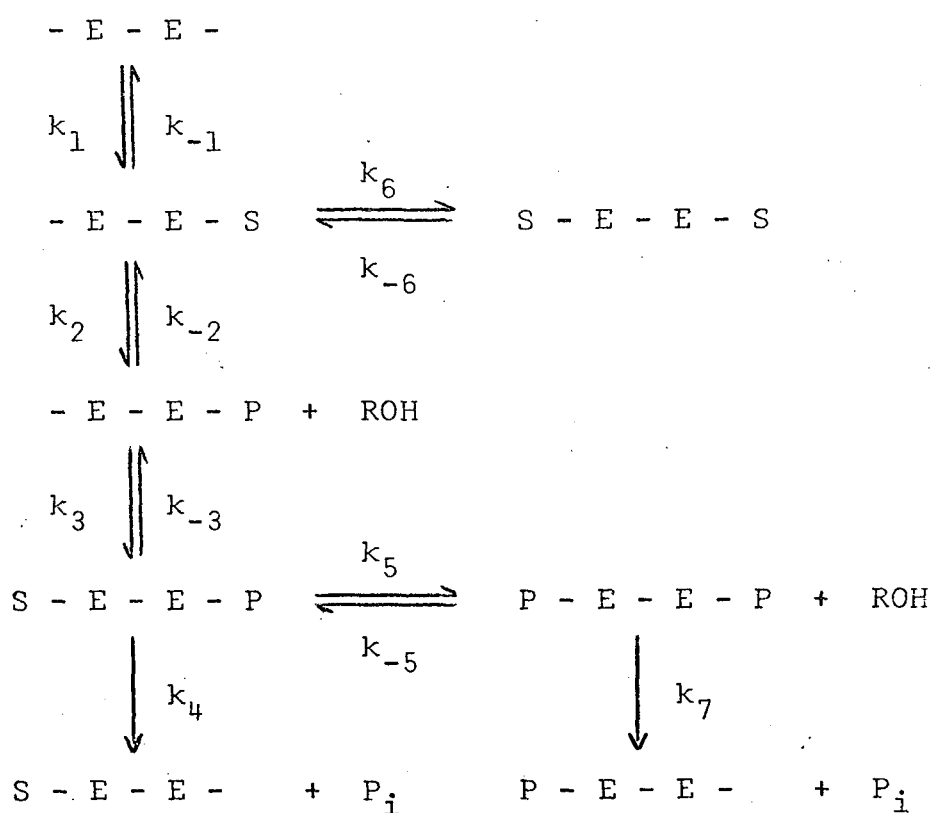
O mecanismo Flip-Flop proposto por Lazdunski,<sup>23</sup> para interpretar a cooperatividade negativa entre as sub-unidades da fosfatase alcalina mantendo a cinética Michaelis-Menten, é representado através do esquema 3. Suponha-se a enzima e forma dímera no transcurso da catálise, além de exibir cooperatividade negativa inter e intra-sub-unidade. Inicialmente, uma molécula de substrato une-se não covalentemente a uma das sub-unidades da enzima livre, induzindo a uma mudança conformacional dos centros ativos, a qual dificulta a união de outra molécula de substrato. A fosforilação da sub-unidade saturada (etapa 2) retorna a facilidade de ligação de uma outra molécula ao segundo centro ativo (intermediário IV). Este intermediário por desfosforilação do centro fosforilado (etapa 4) forma o intermediário II, a qual corresponde basicamente o mecanismo denominado Flip-Flop. Entretanto, outra possibilidade seria a fosforilação do centro ativo ligado não covalentemente ao substrato, resultando a enzima com dois centros fosforilados. Em ambas as alternativas, a enzima não retorna ao estado livre.

Na determinação da expressão da velocidade partir do mecanismo Flip-Flop a concentração da fosfatase fosforilada é considerada pequena, tornado desprezível, segundo o esquema 3, a etapa inversa da fosforilação ( $k_{-2}$ ). Considerando-se a cooperatividade negativa inter-sub-unidade, a formação do intermediário V, que contém dois grupos fosforilados por molécula de enzima, e o intermediário VI que contém dois fosfatos orgânicos ligados não covalentemente à enzima, a pH alcalino é desprezível. Entretanto a etapa 5 é importante a pH ácido,<sup>20</sup> sendo inclusive a passagem da enzima difosforilada para enzima com um centro ativo fosforilado e outro unido não covalentemente ao substrato ( $k_{-5}$ ) a etapa determinante.

Aplicando o tratamento cinético do estado estacionário à velocidade de desaparecimento dos intermediários meio alcalino, temos;

$$-\frac{dSEEP}{dt} = (k_4 + k_3) SEEP - k_3 EEP \times S = 0$$





esquema 3

$$- \frac{dEEP}{dt} = k_3 \text{ EEP} \times S - k_2 \text{ EES} - k_3 \text{ SEEP} = 0$$

$$- \frac{dEES}{dt} = (k_{-1} + k_2) \text{ EES} - k_1 \text{ EE} \times S = 0$$

donde

$$\text{EEP} = \frac{k_4 + k_{-3}}{k_3} \times \frac{\text{SEEP}}{S}$$

$$\text{EES} = \frac{k_4}{k_2} \times \text{SEEP}$$

$$\text{EE} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \times \frac{\text{EES}}{S}$$

sendo a concentração total de fosfatase alcalina expressada por

$$E_{2t} = \text{EE} + \text{EES} + \text{EEP} + \text{SEEP}$$

obtemos

$$E_{2t} = \left[ \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S} + \frac{k_4}{k_2} + \frac{k_4 + k_{-3}}{k_3 S} + 1 \right] \text{SEEP}$$

$$E_{2t} = \left[ \frac{K_{s1} k_4 + k_2 K_{s2}}{(k_4 + k_2) S} + 1 \right] \text{SEEP}$$

sendo

$$K_{s1} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$K_{s2} = \frac{k_4 + k_{-3}}{k_3}$$

$$\frac{1}{K} = \frac{K_{s1} k_4 + k_2 K_{s2}}{(k_4 + k_2) S} + 1$$

resulta

$$E_{2t} = \frac{1}{K} \times \text{SEEP}$$

onde a velocidade é determinada pelo produto da constante catalítica  $k_4$  pela concentração do intermediário IV (SEEP) e a velocidade máxima por centro ativo, pelo produto de  $k_4$  pela concentração total de enzima.

$$v = k_4 E_{2t} K = V_m \times K \quad (25)$$

$$v = \frac{V_m \times S}{\frac{k_4 K_{s1} + k_2 K_{s2}}{k_4 + k_2} + 1} \quad (26)$$

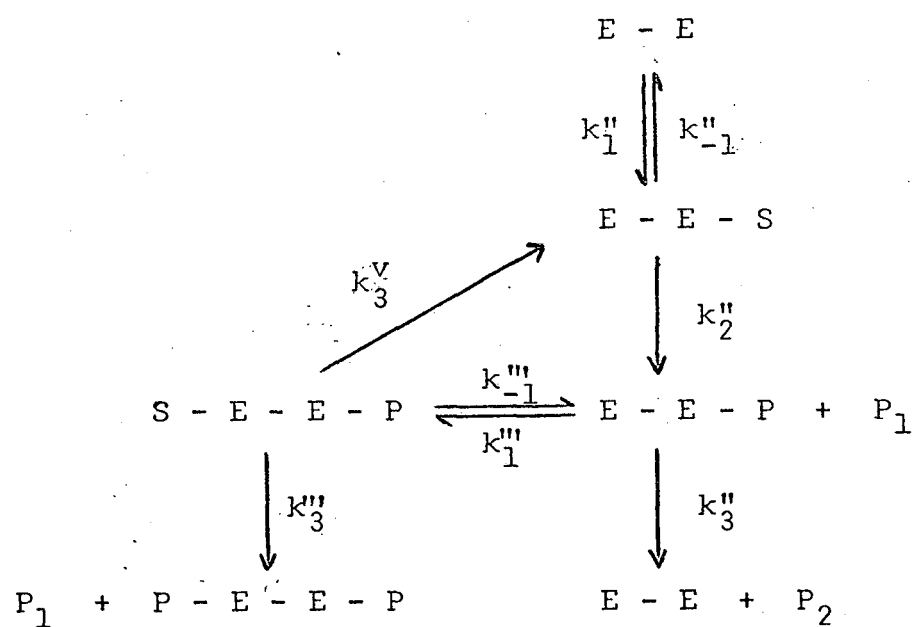
$$K_m = \frac{k_4 K_{s1} + k_2 K_{s2}}{k_4 + k_2} \quad (27)$$

Para diversos substratos, a velocidade máxima será a mesma, uma vez que a etapa determinante do mecanismo proposto (esquema 3) seja a etapa 4. Sendo  $k_4$  pequeno em relação  $k_2$  e  $k_{-3}$  a constante de Michaelis reduz-se à razão entre  $k_{-3}/k$

Neste ponto é importante comparar os mecanismos Flipo-Flop e Monômero-dímero. Para tanto, mesmo partindo fato de que o monômero seja reativo, consideramos para fins comparação a reatividade da enzima somente na forma dímera, no mecanismo monômero-dímero, segundo esquema 4. Fazendo consideração análoga ao mecanismo Flip-Flop, onde o intermediário constituído da enzima com os dois centros ativos fosforilados, a pH calino não é favorecido, resulta como expressão da velocidade equação (28)

$$v = k_3'' \text{EEP} + k_3''' \text{SEEP} \quad (28)$$

A partir das velocidades de desaparecimento dos intermediários obtemos as equações (30a) e (30c), a qual (28) resulta e expressão (31), que é compatível com o mecanismo Flip-Flop considerando que  $E_2P$  seja reativo.



esquema 4

$$-\frac{dEES}{dt} = (k_2'' - k_{-1}'') EES + k_1'' EE \times S = 0 \quad (29a)$$

$$-\frac{dEEP}{dt} = -k_2'' EES + (k_3'' + k_1'' S) EEP - k_{-1}'' SEEP = 0 \quad (29b)$$

$$-\frac{dSEEP}{dt} = (k_{-1}'' - k_3'') SEEP + k_1'' PEEP \times S = 0 \quad (29c)$$

temos

$$EEP = K_A SEEP \times S \quad (30a)$$

onde

$$K_A = \frac{k_3'' - k_{-1}''}{k_1''}$$

$$EES = K_B E_2 \times S \quad (30b)$$

onde

$$K_B = \frac{k_1''}{(k_{-1}'' - k_2'')}$$

$$SEEP = \frac{K_C E_2 \times S}{(1 - K_D K_A S)} \quad (30c)$$

onde

$$K_C = \frac{k_2'' k_1''}{k_{-1}''' (k_{-1}'' - k_2'')}$$

e

$$K_D = \frac{k_3'' + k_1''}{k_{-1}''}$$

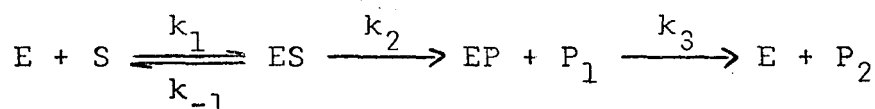
resulta

$$v = (k_3'' K_A S + k_3'') \frac{K_C E_2 \times S}{1 - K_D K_A S} \quad (31)$$

Analogamente a expressão matemática de velocidade, obtida por Simpson e Vallee,<sup>26</sup> a qual considera no mecanismo de duas etapas para cada centro ativo um intermediário enzima-substrato distinto, a expressão (31) é diretamente proporcional à concentração de substrato e de enzima total.

### 3.4. Estudos na etapa transiente

Um mecanismo mais simples de duas etapas para estudo da etapa transiente é analisado no esquema 5.<sup>33</sup>



esquema 5

A obtenção da expressão de formação de produto como função do tempo é analisada a partir das equações de velocidade de formação dos intermediários e produtos. Denotamos  $e$  e  $EP$  como a concentração do intermediário enzima-substrato e enzima fosforilada. Das expressões de velocidade de formação dos intermediários  $ES$  e  $EP$  obtem-se uma equação diferencial de segunda ordem com relação ao intermediário  $ES$ . Sendo a velocidade de formação de  $P_1$  o produto da constante catalítica  $k_2$  pela concentração do intermediário  $ES$ , temos que da resolução da equação diferencial de segunda ordem inicialmente obtida, a expressão da velocidade de formação de  $P_1$  reescrita como função do tempo, concentração de substrato e das constantes catalíticas. Pela integração desta equação final, obtemos a equação desejada,<sup>33</sup> cuja forma é apresentada na Figura 8. A inclinação da parte reta da curva, representa a velocidade obtida sob condições do estado estacionário, enquanto que como coeficiente linear temos a concentração de  $P_1$  a tempo zero que denominamos "burst". A expressão para o "burst" resultante é dado pela equação (32).

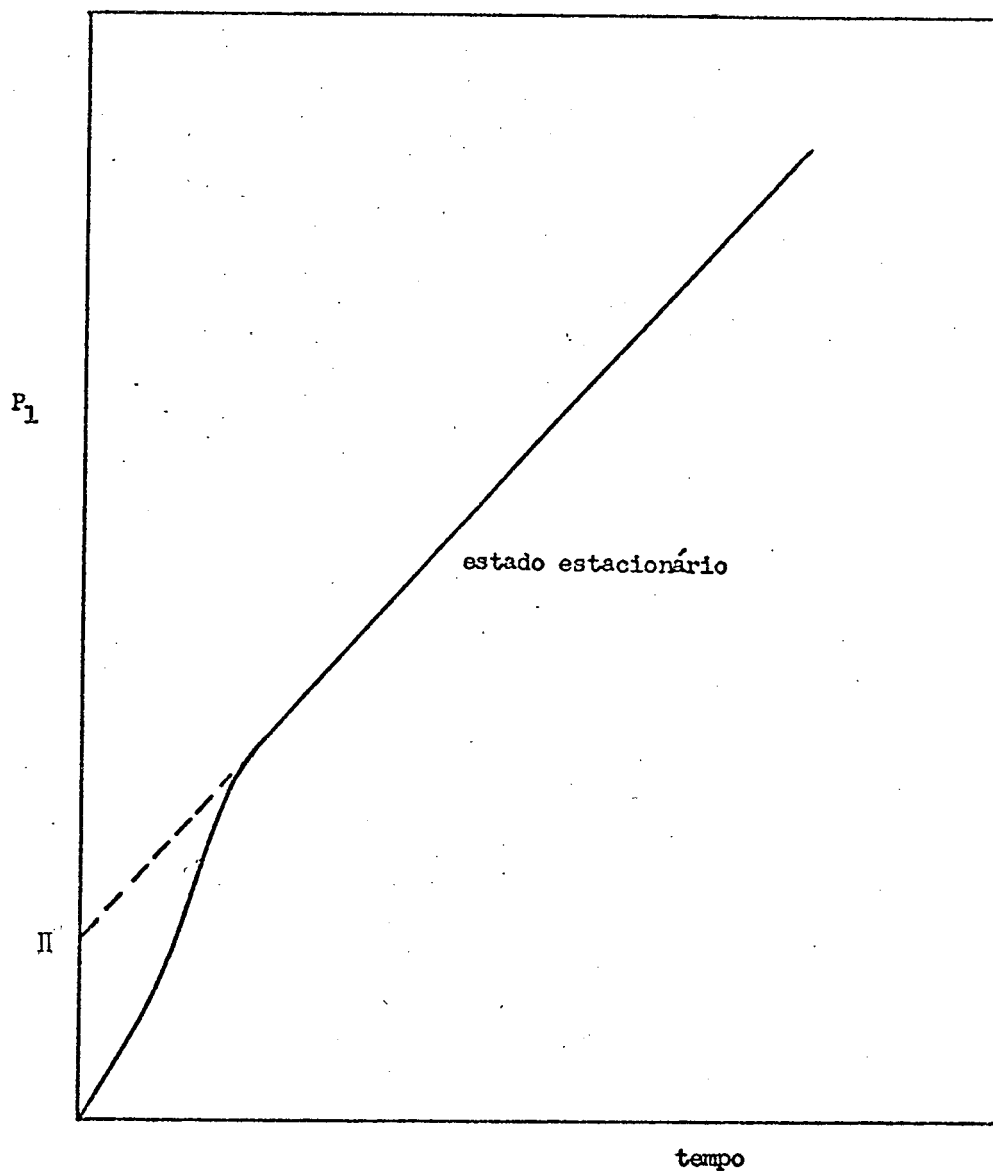


Figura 8:

Diagrama esquemático da função  $P_1$  em função do tempo. A intersecção do prolongamento da parte reta da curva indica o "Burst".

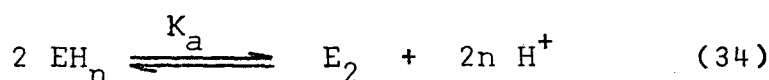
$$\Pi = \frac{k_2^2 E_{2t} S^2}{(k_2 + k_3)^2 (S + K_m)} - \frac{k_2 k_3^2 E_{2t} S}{(S + K_m)^2 (k_2 + k_3)^2 k_1} \quad (32)$$

Considerando os valores obtidos para a E.Coli a razão entre o primeiro e segundo termo que relaciona as constantes é em torno de  $10^7$ , sendo portanto o segundo termo em relação ao primeiro negligenciável, e a alta concentração de substrato  $\Pi$  em relação a  $K_m$ , pode ser simplificado (equação (33)).

$$\Pi = \left( \frac{k_2}{k_2 + k_3} \right)^2 \times E_{2t} \quad (33)$$

Para baixos valores de pH, considerando que a etapa de desfosforilação é mais lenta do que a etapa de fosforilação ( $k_2 \gg k_3$ ) obtém-se  $\Pi$  como igual à concentração total enzima. À medida que o pH aumenta ocorre um decréscimo de  $k_2$  aumento de  $k_3$  com consequente diminuição da relação  $k_2/(k_2 + k_3)$ . Por exemplo, se  $k_2$  torna-se igual a  $k_3$  a relação se iguala a 1.

Segundo diversos autores, o peso molecular da enzima do E.Coli decresce com o pH.<sup>7</sup> Como não sabemos a quantidade de prótons envolvida na dissociação ácida da enzima em forma dímera, devemos estimar a constante de dissociação ácida.



$$K_a = \frac{(\text{E}_2)(\text{H}^+)^{2n}}{(\text{EH}_n)^2}$$

$$\text{pK}_a = 2n \text{pH} + \log \frac{(\text{EH}_n)^2}{(\text{E}_2)^2} \quad (35)$$



sendo

$$K_d = \frac{(EH_n)^2}{(E_2)}$$

e assumindo o valor de  $K_d$  o mesmo para enzima do E.Coli e de frango a pH 6,89 como igual a  $0,5 \times 10^{-9}$  e o  $pK_a$  igual a 4, segundo Applebury et al.,<sup>7</sup> pode-se estimar  $n = 1$ , reduzindo a equação (35) para (36).

$$pK_a = 2 \text{ pH} - pK_d \quad (36)$$

Esta equação permite com valores conhecidos de  $K_a$  e pH determinarmos a constante de dissociação dîmero-monômero e a percentagem de enzima em ambas as formas. Considerando-se que o monômero seja reativo com um e o dîmero com dois centros ativos, uma aproximação baseada na efetividade de apenas centro ativo na forma dîmera, leva-nos a reescrever a equação (33) como;

$$\Pi = \left( \frac{k_2}{k_2 + k_3} \right)^2 E_{2t} \cdot 2 \left( \frac{\%E}{100} + \frac{\%E_2}{100} \right) \quad (37)$$

Passamos, portanto, a calcular o "burst" 2,4-DNF a partir de determinados valores de pH,  $pK_a$  e concentração total de enzima, donde o número de moles liberados é dependente do número de centros ativos, permitindo verificar a reatividade ou não reatividade do monômero. Da comparação dos valores calculados com os valores obtidos experimentalmente<sup>40</sup> (Tabela determinamos a menor razão entre as constantes  $k_2/k_3$  do esquema 5, através do menor resíduo quadrático médio (Tabela VI, Figura

Analogamente, análise de valores distintos para a razão  $k_2/(k_2 + k_3)$  de monômero e dîmero foi seguida. Entretanto, não foi observado influência nos valores anteriormente tidos, para consideração de que a razão entre as constantes catalítica de fosforilação e desfosforilação seja idêntica.

Da aplicação do modelo proposto para a etapa transiente da reação, obtem-se a razão  $k_2/k_3$ . A curva calculada

TABELA V

"Burst" do 2,4-DNF, a diferentes valores de pH

pH	$10^7$ b	$10^7$ enzima c
4,0	13,0	5,6
	15,5	7,4
	25,0	11,3
	37,5	19,6
4,4	13,0	7,4
	20,0	11,3
	26,5	19,6
5,0	3,5	5,6
	8,0	7,4
	8,8	11,3
	12,5	19,6
5,5	7,0	11,3
	11,0	19,6
5,7	4,3	7,4
	8,0	19,6

a) referência 40

b) moles de 2,4-DNF

c) mol/lit. da enzima considerada como dímero

TABELA VI

Otimização da razão  $k_2/k_3$  a distintos valores de pH e  $pK_a$ .

$pK_a$	pH	$\left( \frac{k_2}{k_2 + k_3} \right)^2$	$\frac{k_2}{k_3}$
4,0	4,0	1,00	
4,0	4,4	0,88	15,151
4,0	5,0	0,51	2,498
4,0	5,5	0,52	2,586
4,0	5,7	0,43	1,904
3,5	4,0	1,00	
3,5	4,4	0,98	98,497
3,5	5,0	0,57	3,082
3,5	5,5	0,52	2,586
3,5	5,7	0,45	2,038

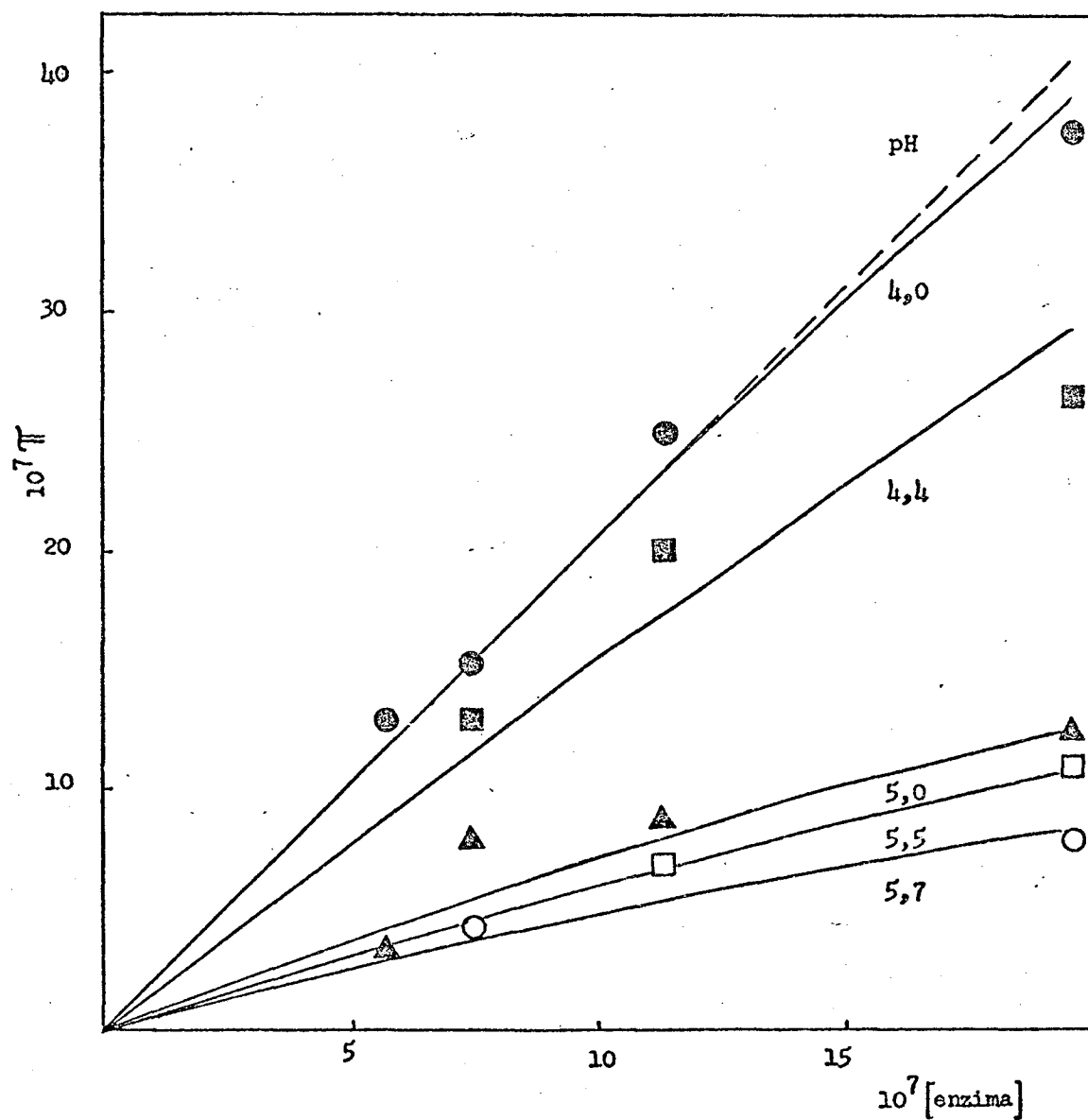


Figura 9:

"Burst" do 2,4-DNF para valores calculados a partir do menor somatório quadrático médio, em relação ao valores experimentais (ver referência 40) versus / concentração total de enzima.

de  $\Pi$  versus concentração total de enzima apresenta forma semelhante à obtida experimentalmente, o que nos permite notar a reatividade do monômero através da inclinação da curva (Figura 9). A alta concentração total de enzima, maior concentração desta se encontra na forma dímera com apenas um centro ativo efetivo, apresentando um menor número de moles de 2,4-DNF liberados no "burst" pela enzima. Se apenas o dímero for reativo, teremos curva pontilhada (Figura 9), a qual indica a proporcionalidade da velocidade com a concentração total de enzima.

### 3.5. Determinação do "Burst"

Num mecanismo de duas etapas (esquema 5), a hidrólise de um substrato em presença de uma determinada enzima a rápida liberação do produto  $P_1$  da primeira etapa pode ser de terminada antes de alcançar as condições do estado estacionário através da técnica do fluxo detido ("stopped flow").

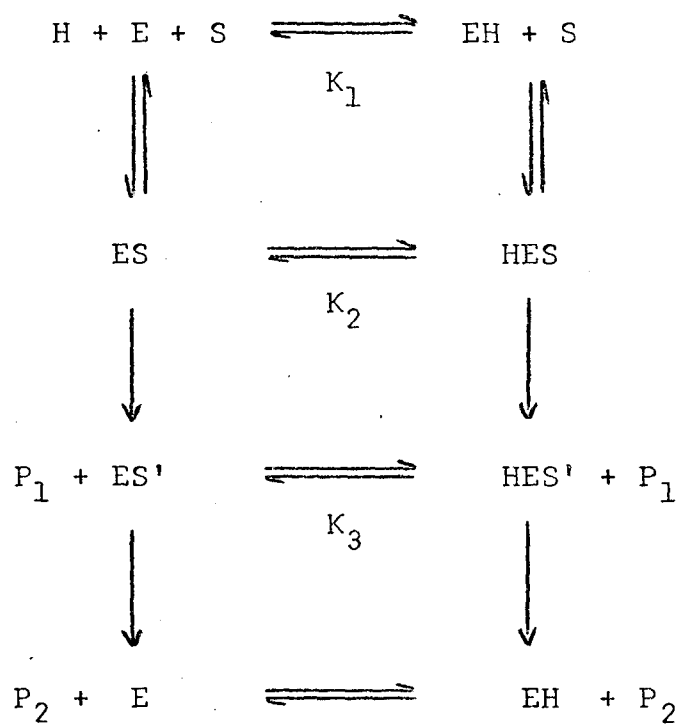
Após a etapa transiente se observa hidrólise de ordem zero do substrato.

Nosso objetivo nesta etapa do trabalho foi terminar uma expressão matemática que relacione  $P_1$  com o tempo para o mecanismo monômero-dímero, em função de constantes ou tempos conhecidos.

Bender<sup>34</sup> obteve uma expressão para variação de  $P_1$  com o tempo, no mecanismo da hidrólise de ésteres, tais como p-nitrofenilacetato (p-NFA) catalisada por  $\alpha$ -quimotripsina. O esquema inclui equilíbrio de protonação do intermediário enzima-substrato (ES), do intermediário enzima-acilo (ES'), bem como protonação da enzima livre (esquema 6). Para tanto denotou a soma das espécies protonadas e ionizadas da enzima com o símbolo  $E_{tot}$  (total). Assim  $(E)^{tot}$ ,  $(ES)^{tot}$  e  $(ES')^{tot}$  se referem a formas de enzima livre, complexo enzima-substrato e a enzima acilada respectivamente, e  $E_0$  concentração total da enzima.

Expressões semelhantes foram obtidas para constantes de formação das espécies  $(ES')^{tot}$ ,  $k_2^{tot}$  e de desacilação  $k_3^{tot}$ .

Obtendo-se uma expressão integrável para  $(ES')^{tot}$ , pode-se integrar a equação diferencial obtida para  $(ES)^{tot}$   $\left[ d(ES)^{tot}/dt = dP_1/dt \right]$  obtendo-se a relação de  $P_1$



esquema 6

função do tempo e constantes que incluem  $E_0$  e  $S_0$  (concentração inicial de substrato).

Devido a semelhança entre os mecanismos apresentados no esquema 6 e aquele para o mecanismo monômero-dímero para a etapa transiente (esquema 7), tentou-se calcular  $P_1$  como função do tempo. No esquema 7 o mecanismo da hidrólise através da enzima dímera é expressado em forma similar ao mecanismo Flip-Flop, considerando-se que não só a enzima livre dímera ( $E_2$ ) está já em equilíbrio com seu monômero, mas também cada um dos intermediários  $E_2S$  e  $E_2P$ . Entretanto, um ponto de complexidade entre os mecanismos, consiste no fato de formar  $P_1$  também na etapa de formação da espécie dímera com dois centros fosforilados (PEEP).

Denotando-se  $K_d$ ,  $K'_d$  e  $K''_d$  como as constantes de dissociação da enzima livre, do intermediário enzima-substrato ( $E_2S$ ) e enzima fosforilada ( $E_2P$ ) e considerando a concentração dos intermediários enzima-substrato unidos não covalentemente como a soma de  $E_2S$  e  $ES$ ,  $(ES)^{tot}$ , passamos a escrever:

$$k_2^{tot} = k_2'' \frac{E_2S}{ES^{tot}} + k_2' \frac{ES}{ES^{tot}} \quad (39)$$

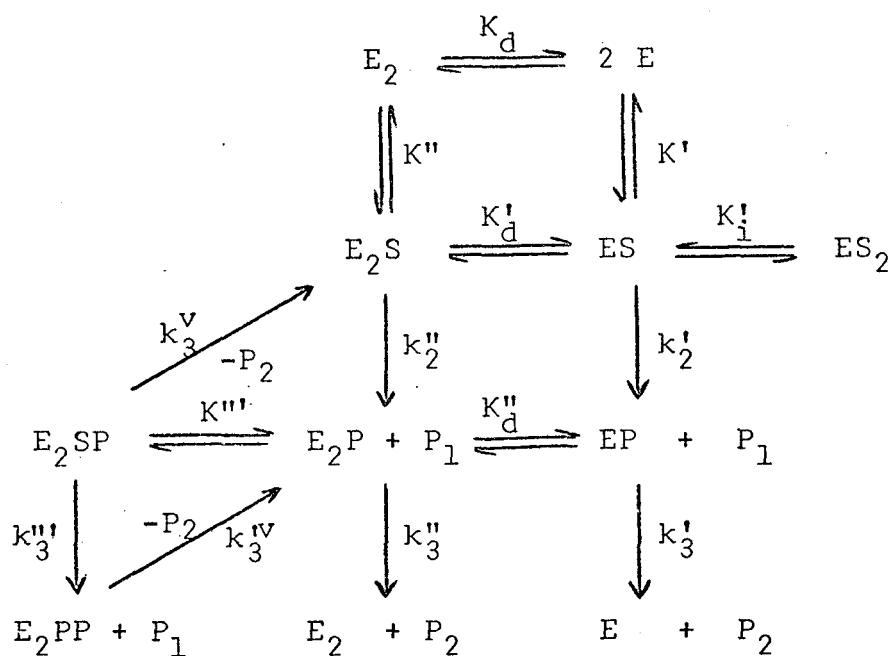
sendo as razões  $E_2S$  e  $ES$  com relação a  $ES^{tot}$  as respectivas frações molares. Da equação (39) temos as equações (40) e (41);

$$x_{E_2S} = \frac{k_2^{tot} - k_2'}{k_2'' - k_2'} \quad (40)$$

$$E_2S = \frac{k_2^{tot} - k_2'}{k_2'' - k_2'} \times ES^{tot} \quad (41)$$

Analogamente, pode-se expressar  $ES$  em termo de  $(ES)^{tot}$ , através da equação (42);

$$ES = \frac{k_2^{tot} - k_2''}{k_2' - k_2''} \times ES^{tot} \quad (42)$$



esquema 7



Para obter uma expressão mais simples, assumiu-se que  $k_3'''$  desprezível. A velocidade de formação de  $P_1$  é apresentada pela equação (43a), a qual pode ser facilmente reescrita em termos de  $(ES)^{tot}$  (equação (43b)). Tomando-se como  $k_2$  relação entre as constantes da equação (43b), a velocidade de formação de  $P_1$  pode ser simplificada ao produto da constante  $k_2$  pela concentração total do intermediário enzima-substrato.

$$\frac{dP_1}{dt} = k_2' ES + k_2'' E_2S \quad (43a)$$

$$\frac{dP_1}{dt} = k_2' \frac{k_2^{tot} - k_2''}{k_2' - k_2''} + k_2'' \frac{k_2^{tot} - k_2'}{k_2'' - k_2'} ES^{tot} \quad (43b)$$

$$\frac{dP_1}{dt} = k_2 ES^{tot} \quad (43c)$$

Sendo a velocidade de desaparecimento  $d(ES)^{tot}$  dada pela equação (44), devemos tornar a velocidade de formação do intermediário (SEEP) integrável e levando à equação (44), obtemos a expressão de  $(ES)^{tot}$  em função do tempo e consequentemente a equação (43c) integrável.

$$-\frac{dES^{tot}}{dt} = k_2 ES^{tot} - k_3 SEEP \quad (44)$$

A expressão de velocidade de desaparecimento do intermediário (SEEP), equação (45), pode ser escrita em termos de  $(ES)^{tot}$  e (SEEP), equação (46), onde as letras maiúsculas denotam uma relação entre constantes e E a enzima na forma monomérica.

$$-\frac{dSEEP}{dt} = k_3''' SEEP - k_2'' E_2S + k_3'' E_2P + k_3' EP - k_2' ES \quad (45)$$

$$-\frac{dSEEP}{dt} = -k_2 ES^{tot} + A + \frac{B}{E} SEEP \quad (46)$$

$$A = k_3^v + \frac{k_3'' K''}{S}$$

$$B = \frac{k_3' K_d' K'''}{S}$$

Analogamente, a partir da concentração total de enzima ( $E_0$ ), através das constantes de equilíbrio temos a equação (47);

$$F ES^{tot} = E_0 - G + \frac{H}{E} SEEP \quad (47)$$

$$F = 1 + \frac{S}{K_1'} + \frac{K'}{2S} \cdot \frac{k_2^{tot} - k_2''}{k_2' - k_2''} + \frac{K'' k_2^{tot}}{S (k_2' - k_2'')} -$$

$$G = 1 - \frac{K''}{S}$$

$$H = \frac{K_d'' K'''}{S}$$

Da constante de dissociação do intermediário enzima-substrato e enzima livre ( $K'$ ), a enzima livre monomérica é expressada em termos de constantes e  $(ES)^{tot}$ , equação (48), qual levando-se às equações (47) e (46), obtemos (49) e (50) respectivamente.

$$E = \frac{K' k_2^{tot} - k_2''}{S (k_2' - k_2'')} ES^{tot} = I ES^{tot} \quad (48)$$

$$ES^{tot} = - \frac{E_o - G SEEP}{2 F} + \sqrt{\frac{(E_o - G SEEP)^2 - 4 F H SEEP}{2 F}} \quad (49)$$

$$- \frac{dSEEP}{dt} = k_2 ES^{tot} + A SEEP + \frac{B}{I ES^{tot}} SEEP \quad (50)$$

Entretanto, ao levarmos (50) em (49), resulta a equação (51) de difícil integração.

$$- \frac{dSEEP}{dt} = k_2 M + (N + A) SEEP + \sqrt{M_1 + P SEEP + P_1 (SEEP)^2} + \frac{B SEEP}{I M - N SEEP + \sqrt{M_1 + P SEEP + P_1 (SEEP)^2}} \quad (51)$$

$$M = - \frac{E_o}{2F}$$

$$N = \frac{G}{2F}$$

$$P = \frac{2 E_o G - 4 F H}{2 F}$$

$$M_1 = \frac{E_o^2}{2F}$$

$$P_1 = \frac{G^2}{2F}$$

Se as razões entre as constantes B/E e H/E fossem muito pequenas em relação a A e G respectivamente, as expressões (47) e (46) simplificar-se-iam tornando integrável a equação de velocidade de formação de  $P_1$ . Entretanto, esta consi

ração não é válida, pois a partir de uma estimativa da ordem d  
grandeza da relação entre as constantes e enzima livre na forma  
monomérica (Tabela II), a relação não é observada. Da equação r  
sultante da integração da expressão de velocidade a partir da r  
ferida simplificação, quando tornamos o tempo suficientemente  
grande, faz com que o prolongamento da parte reta da curva passe  
pela origem, indicando um valor de  $\Pi$  nulo.

Além dos estudos teóricos anteriormente apresentados, neste trabalho intentou-se também obter dados orientativos sobre a possibilidade de imobilizar a enzima em uma matriz de celulose contendo grupos etil-xantato.

Considerando que se tratava de uma zinco-melo-enzima, estudou-se a complexação do íon  $Zn^{++}$  com etilxantato de etila.

Finalmente, efetuou-se estudos cinéticos aminólise de etilxantato de etila com alguns aminoácidos e proteínas, tendo em vista um estudo mais completo, que visa imobilizar uma enzima pela reação dos grupos amino terminais ou de unidades de aminoácidos de cadeia peptídica, que contenham grupos amina (lisina, arginina, asparagina, prolina, serina, triptofano etc.) com ésteres xânticos unidos a uma matriz de celulose.

### 3.6. Efeito do íon zinco no espectro do EXE

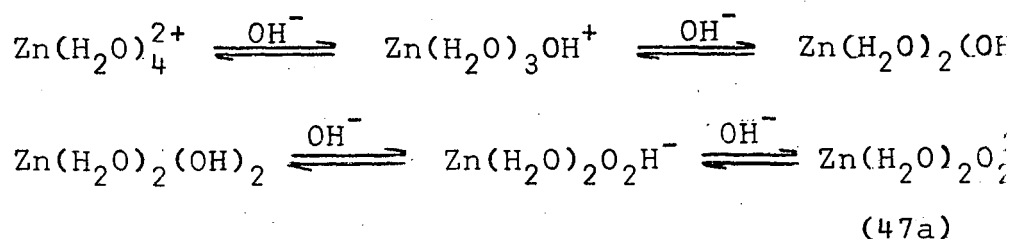
Como nos referimos anteriormente, a fosfatase alcalina é uma zinco-metallo-enzima com número de átomos grama de zinco por mol de proteína variando de dois a quatro.<sup>35</sup> Vallee e co-autores prepararam a enzima com especial atenção para o conteúdo de zinco metálico e determinaram quatro átomos grama por mol de enzima.<sup>11</sup> Dois dos átomos de zinco são facilmente removidos, inativando a enzima e os outros dois aparentemente não envolvidos na ação catalítica, são mais dificilmente removido.<sup>12</sup> Esta inibição da atividade enzimática pode ocorrer, por exemplo através da formação de complexo ou por remoção do metal, por intermédio de um agente quelante.<sup>12</sup>

Estudos simultâneos tem mostrado a presença de 1,3 átomos-grama de magnésio por mol de enzima,<sup>36</sup> sendo que este não ativa a apoenzima, mas somente aumenta a atividade da que possuem zinco em sua composição.<sup>37</sup> O conteúdo metálico é importante não somente para a atividade como também para manter estrutura quaternária da enzima.<sup>35</sup>

Portanto, passamos a analisar a possível complexação de íons zinco com etilxantato de etila, para observarmos a influência deste fenômeno na imobilização da enzima numa matriz sólida de celulose através de uma ligação tionocarbamila.

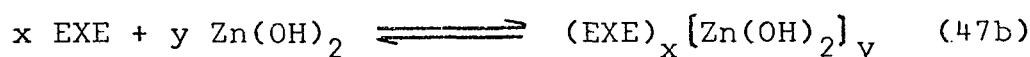
Com esta finalidade observou-se a variação do espectro do EXE em presença de quantidades crescentes de cloreto de zinco, a diferentes valores de pH.

O zinco possui número de coordenação igual quatro, e o íon aquo-zinco se ioniza através de várias etapas, medida que a alcalinidade da solução aquosa aumenta, formando hidróxido de zinco e finalmente os oxianions zincatos<sup>38,39</sup> (eqção 47a).



O hidróxido de zinco tem um valor de  $pK_a$  a  $25^\circ$  igual a  $1,04 \times 10^{-11}$ , donde a pH 10 encontra-se parcialmente ionizado.<sup>41</sup>

Sendo o enxofre melhor doador de elétrons do que o oxigênio, pode ocorrer mais facilmente uma substituição de uma molécula de água do aquo-hidróxido por uma de EXE. É possível que o EXE aceite várias moléculas do hidróxido de zinco ou as diferentes espécies deste, segundo o pH, motivo pela qual na equação de formação dos complexos correspondentes não tem sido considerado as moléculas de água do hidróxido de zinco e tampouco as formas ionizadas deste (equação (47b)). Segundo a equação (47b), x e y são os coeficientes estequiométricos e representando-se a razão  $y/x = m$ , resulta a expressão da constante de formação do complexo segundo a equação (48).



$$K_f = \frac{[(\text{EXE}) \text{ Zn(OH)}_2]_m}{[\text{EXE}] [\text{Zn(OH)}_2]^m} \quad (48)$$

Ao logaritmarmos a expressão (48), a razão entre a concentração do complexo e a concentração de EXE pode ser escrita em termos das absorbâncias lidas.

$$\log \frac{[\text{complexo}]}{[\text{EXE}]} = \log K_f + m \log [\text{Zn(OH)}_2] \quad (48a)$$

Denotando-se  $(A_o, C_E, \epsilon_E)$ ,  $(A_\infty, C_c, \epsilon_c)$  e  $\epsilon$  absorbâncias, concentrações e absorvâncias molares do EXE complexo respectivamente, a absorbância total observada ( $A_t$ ) dada por;

$$A_t = (C_o - C_E) \epsilon_c + C_E \epsilon_E \quad (49)$$

onde

$$C_o = C_E + C_c \quad (50)$$

e portanto

$$C_E = \frac{A_\infty - A_C}{\epsilon_C - \epsilon_E} \quad (51)$$

$$C_C = \frac{A_C - A_O}{\epsilon_C - \epsilon_E} \quad (52)$$

A razão entre as concentrações do complexo EXE ( $C_O/C_E$ ) é igual a  $(A_C - A_O)/(A_\infty - A_C)$ .

$$\log \frac{A_C - A_O}{A_\infty - A_C} = \log K_f + m \log [\text{Zn(OH)}_2] \quad (53)$$

Levando a gráfico o logarítmo da razão entre  $(A_C - A_O)$  e  $(A_\infty - A_C)$  versus logaritmo da concentração total zinco (equação 53), deveria obter-se uma reta cujo coeficiente angular seria  $m$ .

Para EXE ( $4,3 \times 10^{-5}$  M) em 10 mM de bicarbonato de sódio a pH 7 (Figura 10A) o valor de  $m$  é igual a 2, correspondente a dois moles de zinco para cada mol de EXE. Variando o pH para 10 (Figura 10B), mantendo-se as demais condições, observa-se uma curva com um aumento de  $m$  quando se aumenta a concentração de cloreto de zinco. Esta variação está num intervalo de 2 a 4 átomos de zinco por molécula de EXE (Tabela VII).

A pH igual a 4, não foi observada variação absorvância do EXE a 260 nm.

Portanto existe a formação de complexo entre EXE e as espécies de hidróxido de zinco, em solução aquosa, sendo dependente do pH. Decresce em complexidade e estabilidade decrescer o pH.



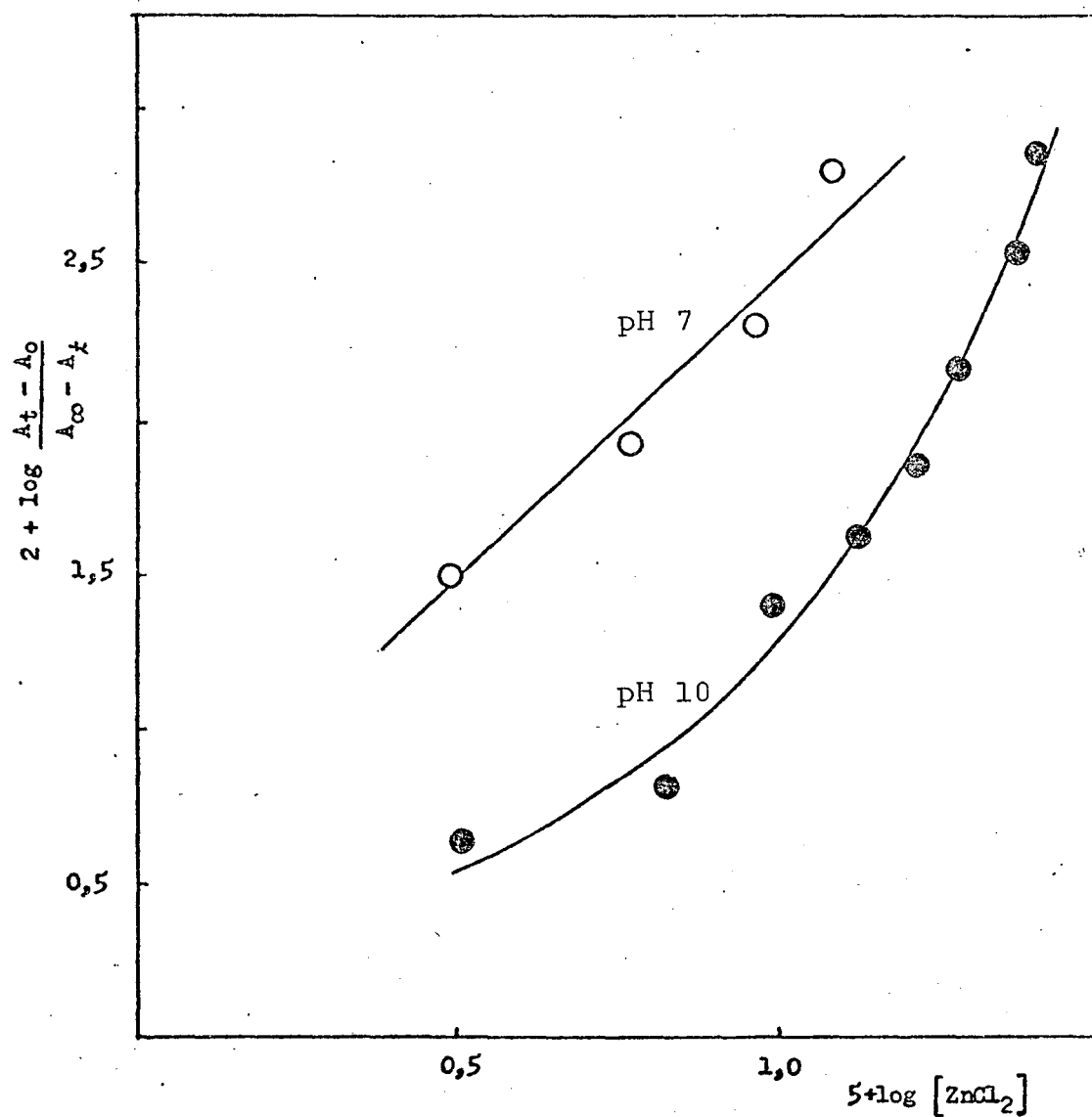


Figura 10:

Determinação da relação de complexação entre EXE e íon  $Zn^{++}$ ,  $[EXE] = 4,3 \times 10^{-5} M$ ,  $NaHCO_3$  10 mM a 260 nm, a diferentes valores de pH.

TABELA VII

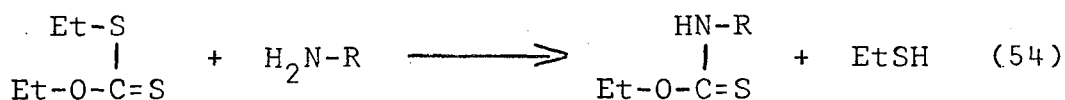
Influência dos íons  $\text{Zn}^{++}$  na absorbância do EXE.<sup>a</sup>

pH	$10^5 \text{ ZnCl}_2$	Absorbância
10	-	0,145
	3,43	0,160
	6,86	0,170
	10,29	0,230
	13,71	0,270
	17,15	0,320
	20,58	0,350
	24,01	0,480
	27,43	0,525
	30,87	0,580
7	34,30	0,580
	-	0,175
	3,14	0,245
	6,29	0,310
	9,43	0,370
	12,57	0,430
	15,71	0,470
	18,86	0,470

a) A 18,6 °C e  $\lambda = 260 \text{ nm}$ .

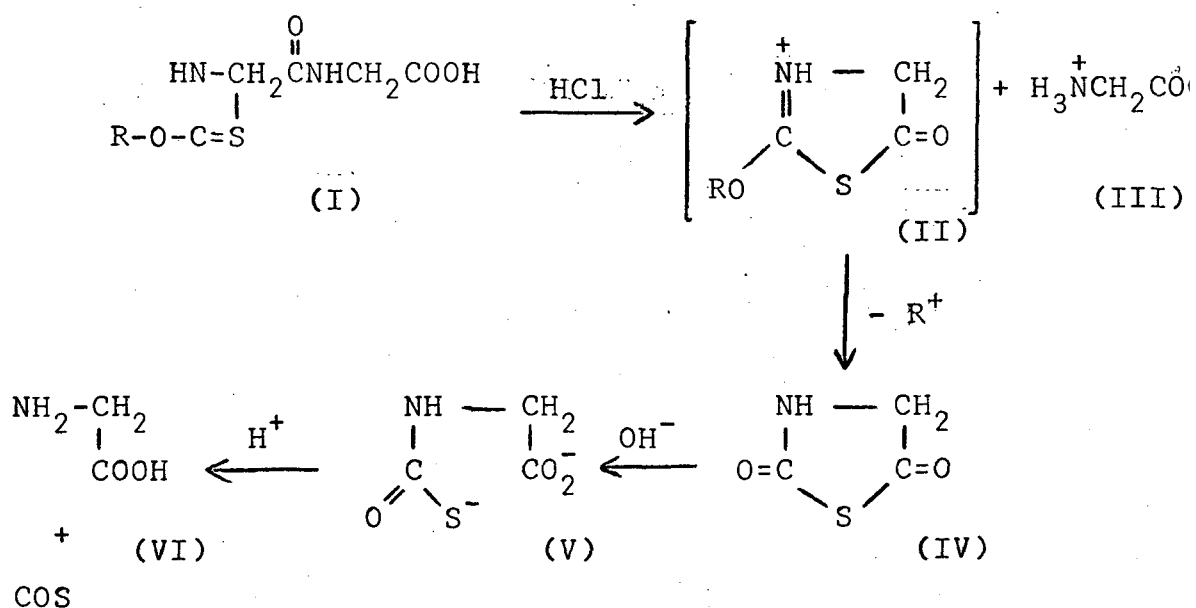
### 3.7. Aminólise do EXE

A aminólise do EXE é representada pela equação (54), a qual forma monotionocarbamato de etila e etil mercaptano. R denota a sequência de um aminoácido ou de uma cadeia peptídica.



Este tipo de reação entre dialquilxantato glicina, formando alquil monotionocarbamato N-acético, foi anteriormente estudado por Aubert e Knott,<sup>42</sup> para desenvolvimento de métodos de degradação de peptídeos.

A reação de dialquilxantato com glicilglicina forma alquil monotionocarbamato acetil glicina (I), o qual é instável em presença de ácido clorídrico em nitrometano anidro que catalisa o ataque nucleofílico do enxofre sobre o carbonilo peptídico próximo, formando o intermediário 2-alcoxitiazol-5-ona (II).



Para separação do produto cristalino (IV), solução de nitrometano é evaporada a temperatura baixa e o res

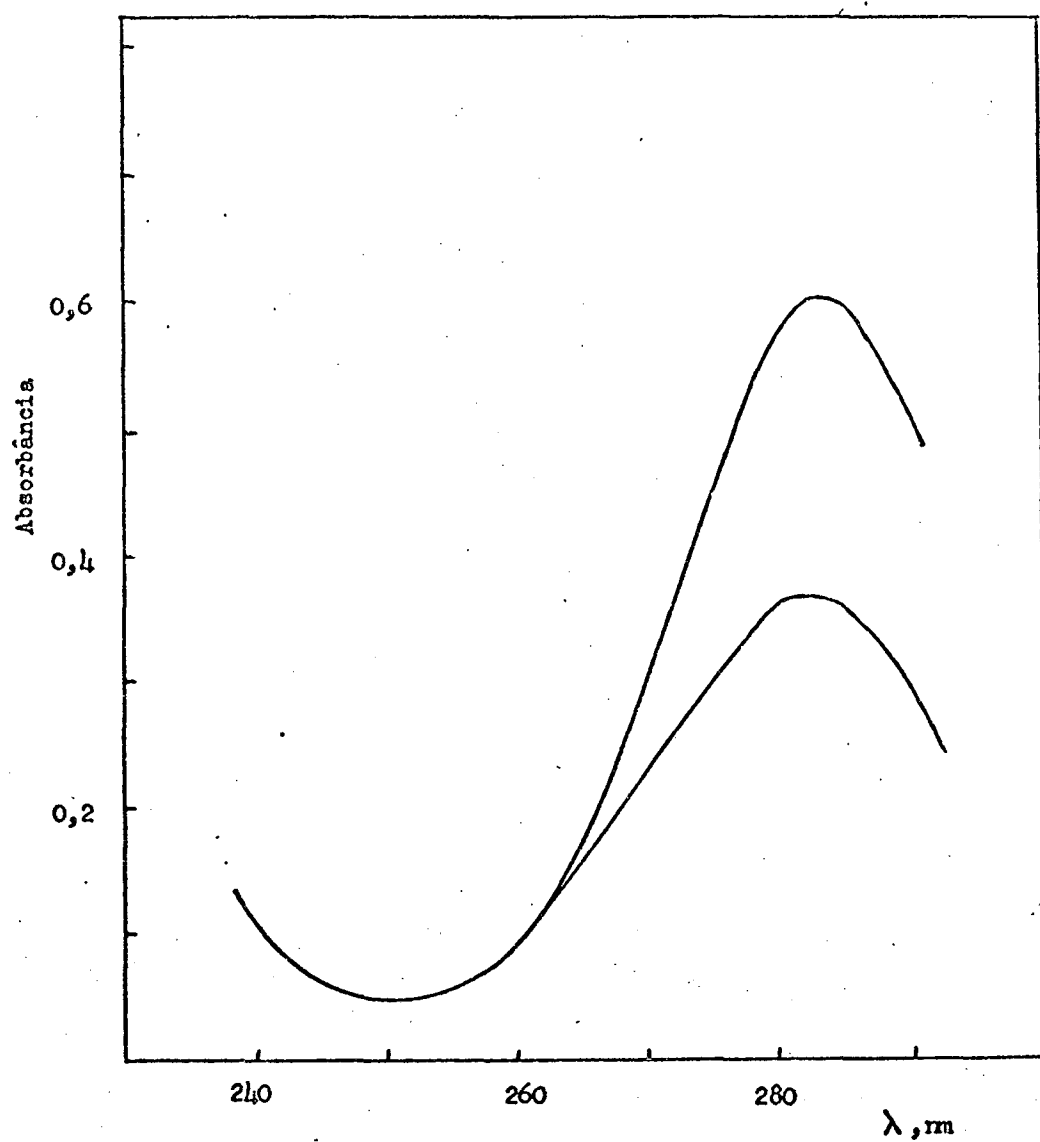


Figura 11:

Espectro ultra-violeta da hidrólise do EXE ( $4,8 \times 10^{-5}$  M) em  $\text{NaHCO}_3$  10 mM, pH 11, a tempo zero e após 16 horas de reação a  $25,0^\circ\text{C}$ .

duo tratado com hidróxido de sódio e neutralizado com ácido clorídrico, resultando o aminoácido retirado da cadeia peptídica inicial (VI).

Neste trabalho prentedeu-se estudar a reação de um éster xântico, tal como etilxantato de etila, com alguns aminoácidos, polipeptídeos e proteínas, mas com a finalidade obter o monotionocarbamato em forma estável, motivo pela qual sou-se solução aquosa em ambiente alcalino.

Para determinação da constante de velocidade de pseudo primeira ordem da reação com EXE e a amina, calculou-se do coeficiente angular do gráfico do logarítmo da diferença da absorbância a qualquer tempo e da absorbância a tempo infinito versus tempo. Da razão da constante observada pela concentração dos aminoácidos, dipeptídeos ou proteína empregados obteve-se a constante de segunda ordem.

A reação do EXE e albumina bovina foi medida a tempo zero e tempo infinito, a 35 °C e pH 11. Pensou-se que com tais dados poder-se-ia calcular o número de grupos amina albumina, que reagiram com EXE. Entretanto, a hidrólise parcial do EXE nestas condições e a baixa concentração de proteína utilizada (aproximadamente cem vezes inferior a de EXE) não nos levaram a resultados conclusivos.

A reação com EXE e ribonuclease foi acompanhada cineticamente a pH 11, com tampão bicarbonato a 25 °C. Ribonuclease é uma enzima que contém uma cadeia de 124 resíduos de aminoácidos, com as extremidades constituídas por lisina e valina respectivamente. O valor médio obtido para constante de segunda ordem foi de  $0,363 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Tabela VIII).

Como referência, usou-se uma amostra de albumina nas mesmas condições de pH, temperatura e tampão para correção da concentração de EXE que tenha efetivamente reagido.

O valor superior da constante de segunda ordem da ribonuclease em relação aos aminoácidos e dipeptídeo é coerente com o fato destes possuírem apenas um grupo amina livre contra os vários contidos na ribonuclease. Uma etapa para posterior investigação será a determinação dos grupos amina da referida proteína que reagem.

Para determinação das constantes de segunda

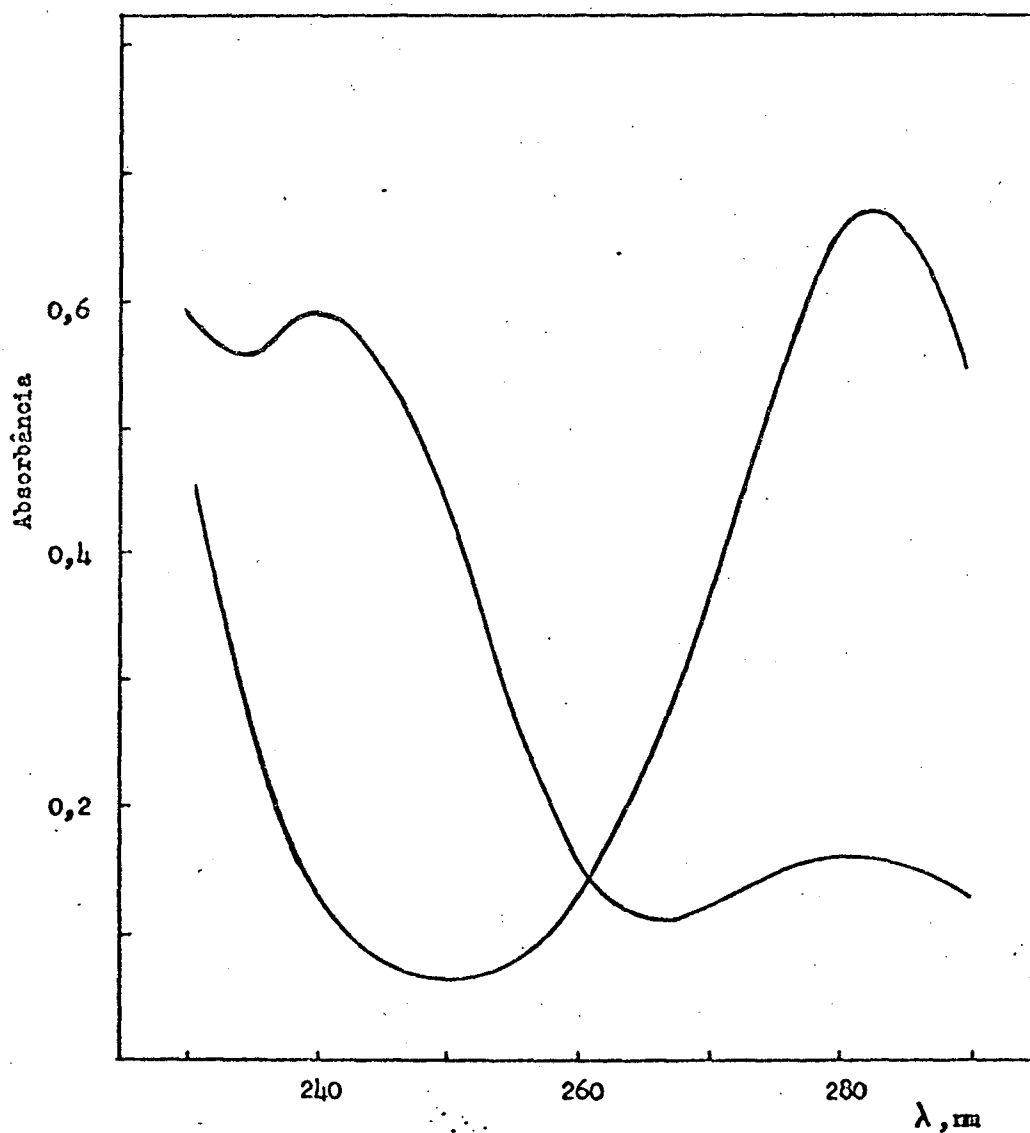


Figura 12:

Espectro ultra-violeta da reação de aminólise do EXE ( $5,4 \times 10^{-5}$  M) com glicina ( $3 \times 10^{-3}$  M) a pH 11 em bicarbonato 10 mM, a tempo zero e após 16 horas de reação na temperatura de 25 °C.

ordem da reação do EXE com glicina, glicinato de etila e glicil glicina, foi seguido procedimento análogo ao empregado para ribonuclease. Os valores obtidos são apresentados na Tabela VI. O acompanhamento da aminólise do EXE com glicina foi tomado o espectro de absorção ultra violeta do EXE (Figura 11) e da mistura reacional (Figura 12) a tempo zero e após dezesseis horas de reação.

TABELA VIII

Valores das constantes de segunda ordem para a aminólise de aminoácidos, dipeptídeos e proteína.<sup>a</sup>

$10^4 \text{ M}$	$10^5 k_{\text{obs}}, \text{seg}^{-1}$	$10^2 k_2, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\text{pK}_a$
Ribonuclease			
1,11	4,2	37,8	
0,78	2,7	34,7	
		média 36,3 $\pm$ 2,2	
Glicinato de etila			
9,0	4,0	4,44	
6,0	3,0	5,00	7,6
3,0	2,2	7,33	
		média 5,59 $\pm$ 1,5	
Glicina			
9,0	3,0	3,33	
6,0	2,8	4,62	9,6
		média 3,98 $\pm$ 0,9	
Glicilglicina			
9,0	1,31	1,45	
6,0	1,14	1,90	8,13
		média 1,68 $\pm$ 0,3	

a) Condições de reação; pH = 11, T = 25,4 °C, bicarbonato de sódio 0,025 M.



BIBLIOGRAFIA

1. COLEMAN, J. E. Progr. Bioorg. Chem., 1: 159, 1971.
2. LAZDUNSKI, M et all. Intestinal Alkaline Phosphatase. Catalytic Properties and Half of the Site Reactivity. Biochemistry, 13 (9): 1788, 1974.
3. HARKNESS, D. R. Studies on human placental alkaline phosphatase. Purification and crystallization. Archive of Biochemistry and Biophys., 126: 503-12, 1968.
4. HULETT-CROWLING, F. M. & CAMPBELL, L. L. Molecular weight and subunits of the alkaline phosphatase of Bacillus Licheniformis. Biochemistry, 10 (8): 1371, 1971.
5. FOSSET, M. & CHAPPELET-TORDO, D. & LAZDUNSKI, M. Intestinal alkaline phosphatase. Physical properties and quaternary structure. Biochemistry, 13 (9): 1783, 1974.
6. ROTHMAN, F. & BYRNE, R. Fingerprint analysis of alkaline phosphatase of alkaline phosphatase of Escherichia Coli K<sub>12</sub>. J. Mol. Biol., 6: 330-40, 1963.
7. APPLEBURY, M. & COLEMAN, J. Escherichia Coli alkaline phosphatase. Metal binding, protein conformation and quaternary structure. J. Biol. Chem., 244 (2): 308-18, 1969.
8. WINZOR, D. J. Dissociation of alkaline phosphatase from Escherichia Coli under conditions for enzymic assay. Biochem. Biophys. Acta, 200: 423-25, 1970.
9. SCHLESINGER, M. J. & LEVINTHAL, C. Hybrid protein formation of E. Coli alkaline phosphatase leading to in vitro complementation. J. Mol. Biol., 7: 1-12, 1963.
10. LAZDUNSKI, C. & PETITCLERC, C. & LAZDUNSKI, M. Structure-function relationships for some metalloalkaline phosphatases of E. Coli. J. Biochem., 8: 510-17, 1969.
11. SIMPSON, R. & VALLEE, B. L. Two Differentiable Classes of Metal Atoms in Alkaline Phosphatase of E. Coli. Biochemistry, 7 (12): 4343, 1968.
12. HINBERG, I, & LAIDLER, K. Influence of pH on the kinetics of reactions catalysed by alkaline phosphatase. Can. J. Biochemistry, 51: 1096, 1973.

13. HUMERES, E. & NOME, F. & ARANDA, V. Trabalho não publicado
14. CHUSSLER, H. Bioch. Biophys. Acta, 151: 383-93, 1968.
15. FOSSET, M. & CHAPPELET-TORDO, D. & LAZDUNSKI, M. Biochemistry, 9: 1973.
16. HEPPEL, L. A. & HARKNESS, D. R. & HILMOE, R. J. A study of the substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of Escherichia Coli. J. Biol. Chem., 23 (3): 841, 1962.
17. NORTON, R. K. The kinetics of hydrolysis of phenyl phosphate by alkaline phosphatases. J. Biochem., 65: 675, 1957.
18. FERNLEY, H. N. & WALKER, P. G. Kinetic behaviour of calf intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphate. Biochemistry, 97: 95-103, 1965.
19. ROSS, M. H. & ELY, J. O. & ARCHER, J. G. Alkaline phosphatase activity and pH optima. J. Biol. Chem., 192: 561-8, 1951.
20. SCHWARTZ, J. H. The phosphorylation of alkaline phosphatase. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 49: 871-8, 1963.
21. ENGSTROM, L. Formation of a phosphoryl-enzyme during hydrolysis of  $P^{32}$ -labeled glucose 6-phosphate by alkaline phosphatase from calf intestinal mucosa and Escherichia Coli. Arkiv Kemi 19: 129-40, 1962.
22. SCHWARTZ, J. H. & CRESTFIELD, A. M. & LIPMANN, F. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 49: 722, 1963.
23. LAZDUNSKI, M. Flip-Flop mechanism and half site enzymes. Current Topics in Cellular Regulation, 6: 267-311, 1972.
24. MILSTEIN, C. The amino acid sequence around the reactive serine residue in alkaline phosphatase from E. Coli. J. Biochem., 92: 410-21, 1964.
25. SIMPSON, R. T. Negative homotropic interactions in binding of substrate to alkaline phosphatase of Escherichia Coli. Biochemistry, 9 (4): 1970.
26. COLEMAN, J. et al. J. Biol. Chem., 245: 4975, 1970.
27. LEVITZKI, A. & STALLCUP, W. & KOSHLAND, D. E. Half of

- sites reactivity and the conformational states of cytidin triphosphate synthetase. Biochemistry, 10: 3371, 1971.
28. VOGEL, J. Practical Organic Chemistry, Londres, Spptiswode Ballantyne, 1956 p. 499.
  29. LOWRY, O. H. & LOPEZ, J. A. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate ester. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
  30. HUMERES, E. Hydrolysis of Sugar Phosphates Enzymatic Hydrolysis of some Arylphosphates. Santa Barbara, 1968. 171. Datilografado. Bibliografia p. 165-71. Doctor of Philosophy in Chemistry, University of California.
  - 31a. BENKOVIC, S. J. & BENKOVIC, P. A. J. Amer. Chem. Soc., 88 5504, 1966.
  - 31b. FENDLER, J. H. & FENDLER, E. J. & SMITH, L. W. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 2097, 1972.
  32. ARANDA, V. Hidrolisis de alguns alquilfenilfosfatos catalizados por fosfatasa alcalina intestinal. Santiago. 1974 48 f. Datilografado. Bibliografia p. 47-8 Grado Académico de Licenciado em Quimica. Universidad Catolica de Chile.
  33. OUELLET, L. & STEWART, J. A. Theory of the transiente phase in an enzyme system involving two wnzyme-substrate complexes. Can. J. Chem., 37: 1959.
  34. KEZDY, F. J. & BENDER, M. L. The kinetics of the  $\alpha$ -chymotrypsin catalysed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. Biochemistry, 1 (6), 1962.
  35. TROTMAN, C. N. A. & GREENWOOD, C. Effects of zinc and other metal ions on the stability and activity of Escherichia coli alkaline phosphatase. J. Biochem., 124: 25-30, 1971
  36. BOSTON, W. F. & KENNEDY, F. S. & VALLEE, B. L. Biochemistry, 14: 2275, 1975.
  37. VALLEE, B. L. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 72, 29 1975.
  38. MOELLER, T. Inorganic Chemistry. New York, J. Wiley, 1966 p., pag. 849 e 866.

39. GOULD, E. S. Inorganic reactions and structure. New York Hold, Rinehart, 1962. 513 p., pag. 84 e 200.
40. DIAZ, S. Hydrolysis of Organic Phosphate Monoesters Catalyzed by E.Coli alkaline phosphatase. Doctor of Philosophy in Chemistry, University of California.
41. WEAST, R. C., ed. Handbook of Chemistry and Physics. 53 ed. Cleveland, Ohio, Chemical Rubber, 1972/1973.
42. AUBERT, P. & KNOTT, E. B. Syntesis of 2,5-thiazolidinedione. Nature, 166: 1039-40, 1950.
43. KENNER, G. W. & KHORAMA, H. G. II. Selective degradation by removal of the terminal amino acid bearing a free amino group. The use of alkoxydithioformates (dialkil xanthates). J. Chem. Soc., 2076-81, 1952.

Apêndice 1

Otimização das constantes segundo o mínimo somatório do módulo do resíduo. Para determinadas concentrações de / enzima total e substrato, variava-se somente um dos parâmetros do conjunto de constantes e comparava-se com o obtido experimentalmente.

Relação das constantes fornecidas previamente com as respectivas memórias:

Constante	memória	Concent.de subst.	memória
$K_d$	001	$S_1$	011
$K'_1$	002	$S_2$	012
$K''$	003	$S_3$	013
$K'''$	004	$S_4$	014
$k''_2$	005	$S_5$	015
$k'''_2$	006	Veloc. exp. p/ conc. alta enz.	
$k'_2$	007	$E'_1$	026
$k''_2/(K_d \cdot K'')$	008	$E'_2$	027
$k''_2/(K_d \cdot K'' \cdot K''')$	009	$E'_3$	028
$K'$	040	$E'_4$	029
$E'_{2t}$	043	$E'_5$	030
$E''_{2t}$	044	Veloc. exp. p/ conc. baixa enz.	
		$E''_1$	036
		$E''_2$	037
		$E''_3$	038
		$E''_4$	039
		$E''_5$	041

## A.1.1.2.

0000--STP---41	0061--XTO---23	0122--XFR---67	0183--UP---27
0001--XTO---23	0062--2---02	0123--0---00	0184--YE---24
0002--0---00	0063--3---10	0124--1---01	0185--1---01
0003--1---01	0064--STP---41	0125--2---02	0186--7---07
0004--STP---41	0065--XTO---23	0126--UP---27	0187--GTO---44
0005--XTO---23	0066--2---02	0127--YE---24	0188--S/R---77
0006--0---00	0067--9---11	0128--1---01	0189--2---02
0007--2---02	0068--STP---41	0129--7---07	0190--9---11
0008--STP---41	0069--XTO---23	0130--GTO---44	0191--3---10
0009--XTO---23	0070--3---03	0131--S/R---77	0192--XFR---67
0010--0---00	0071--0---00	0132--2---02	0193--3---03
0011--3---03	0072--STP---41	0133--9---11	0194--0---00
0012--STP---41	0073--XTO---23	0134--8---10	0195-- - ---34
0013--XTO---23	0074--3---03	0135--XFR---67	0196--YTO---40
0014--0---00	0075--6---06	0136--2---02	0197-- + ---33
0015--4---04	0076--STP---41	0137--7---07	0198--a---13
0016--STP---41	0077--XTO---23	0138-- - ---34	0199--XFR---67
0017--XTO---23	0078--3---03	0139--YTO---40	0200--a---13
0018--0---00	0079--7---07	0140-- + ---33	0201--PNT---45
0019--5---05	0080--STP---41	0141--a---13	0202--PNT---45
0020--STP---41	0081--XTO---23	0142--XFR---67	0203--XFR---67
0021--XTO---23	0082--3---03	0143--1---01	0204--1---01
0022--0---00	0083--8---10	0144--3---03	0205--1---01
0023--6---06	0084--STP---41	0145--UP---27	0206--UP---27
0024--STP---41	0085--XTO---23	0146--YE---24	0207--YE---24
0025--XTO---23	0086--3---03	0147--1---01	0208--1---01
0026--0---00	0087--9---11	0148--7---07	0209--7---07
0027--8---10	0088--STP---41	0149--GTO---44	0210--XFR---67
0028--STP---41	0089--XTO---23	0150--S/R---77	0211--4---04
0029--XTO---23	0090--4---04	0151--2---02	0212--4---04
0030--0---00	0091--1---01	0152--9---11	0213--UP---27
0031--9---11	0092--STP---41	0153--8---10	0214--YE---24
0032--STP---41	0093--XTO---23	0154--XFR---67	0215--1---01
0033--XTO---23	0094--4---04	0155--2---02	0216--8---10
0034--1---01	0095--0---00	0156--8---10	0217--GTO---44
0035--1---01	0096--XFR---67	0157-- - ---34	0218--S/R---77
0036--STP---41	0097--1---01	0158--YTO---40	0219--2---02
0037--XTO---23	0098--1---01	0159-- + ---33	0220--9---11
0038--1---01	0099--UP---27	0160--a---13	0221--8---10
0039--2---02	0100--YE---24	0161--XFR---67	0222--XFR---67
0040--STP---41	0101--1---01	0162--1---01	0223--3---03
0041--XTO---23	0102--7---07	0163--4---04	0224--6---06
0042--1---01	0103--XFR---67	0164--UP---27	0225-- - ---34
0043--3---03	0104--4---04	0165--YE---24	0226--YTO---40
0044--STP---41	0105--3---03	0166--1---01	0227-- + ---33
0045--XTO---23	0106--UP---27	0167--7---07	0228--b---14
0046--1---01	0107--YE---24	0168--GTO---44	0229--XFR---67
0047--4---04	0108--1---01	0169--S/R---77	0230--1---01
0048--STP---41	0109--8---10	0170--2---02	0231--2---02
0049--XTO---23	0110--GTO---44	0171--9---11	0232--UP---27
0050--1---01	0111--S/R---77	0172--8---10	0233--YE---24
0051--5---05	0112--2---02	0173--XFR---67	0234--1---01
0052--STP---41	0113--9---11	0174--2---02	0235--7---07
0053--XTO---23	0114--3---03	0175--9---11	0236--GTO---44
0054--2---02	0115--XFR---67	0176-- - ---34	0237--S/R---77
0055--6---06	0116--2---02	0177--YTO---40	0238--2---02
0056--STP---41	0117--6---06	0178-- + ---33	0239--9---11
0057--XTO---23	0118-- - ---34	0179--a---13	0240--8---10
0058--2---02	0119--YTO---40	0180--XFR---67	0241--XFR---67
0059--7---07	0120-- + ---33	0181--1---01	0242--3---03
0060--STP---41	0121--a---13	0182--5---05	0243--7---07
			0244-- - ---34

## A.1.3.

0245--YTO---40	0306--DIV---35	0367-- 1 ---01	0428--XFR---67
0246-- + ---33	0307--XFR---67	0368-- 8 ---10	0429-- 4 ---04
0247-- b ---14	0308-- 0 ---00	0369-- UP---27	0430-- 1 ---01
0248--XFR---67	0309-- 4 ---04	0370-- 4 ---04	0431-- - ---34
0249-- 1 ---01	0310--DIV---35	0371-- X ---36	0432--YTO---40
0250-- 3 ---03	0311--XFR---67	0372--XFR---67	0433-- + ---33
0251-- UP---27	0312-- 1 ---01	0373-- 1 ---01	0434-- b ---14
0252-- YE---24	0313-- 7 ---07	0374-- 9 ---11	0435--XFR---67
0253-- 1 ---01	0314-- UP---27	0375--DIV---35	0436-- b ---14
0254-- 7 ---07	0315--XFR---67	0376-- DN---25	0437--PNT---45
0255--GTO---44	0316-- 0 ---00	0377-- + ---33	0438--PNT---45
0256--S/R---77	0317-- 3 ---03	0378-- DN---25	0439--XFR---67
0257-- 2 ---02	0318--DIV---35	0379-- r ---76	0440-- a ---13
0258-- 9 ---11	0319-- DN---25	0380-- UP---27	0441-- + ---33
0259-- 8 ---10	0320-- + ---33	0381--XFR---67	0442-- DN---25
0260--XFR---67	0321-- 1 ---01	0382-- 2 ---02	0443--FMT---45
0261-- 3 ---03	0322--XFR---67	0383-- 0 ---00	0444--FMT---45
0262-- 8 ---10	0323-- 0 ---00	0384-- UP---27	0445--YTO---40
0263-- - ---34	0324-- 1 ---01	0385--XFR---67	0446-- 0 ---7
0264--YTO---40	0325--DIV---35	0386-- 1 ---01	0447-- M ---7
0265-- + ---33	0326--YTO---40	0387-- 9 ---11	0448--CNT---4
0266-- b ---14	0327-- 1 ---01	0388--DIV---35	0449-- a ---1
0267--XFR---67	0328-- 9 ---11	0389-- DN---25	0450-- E ---6
0268-- 1 ---01	0329--XFR---67	0390-- - ---34	0451--YTO---4
0269-- 4 ---04	0330-- 1 ---01	0391-- 2 ---02	0452--FMT---4
0270-- UP---27	0331-- 7 ---07	0392--DIV---35	0453--PNT---4
0271-- YE---24	0332--XSQ---12	0393--YTO---40	0454--PNT---4
0272-- 1 ---01	0333-- UP---27	0394-- 1 ---01	0455-- 0 ---0
0273-- 7 ---07	0334--XFR---67	0395-- 0 ---00	0456--XTO---2
0274--GTO---44	0335-- 0 ---00	0396-- DN---25	0457-- a ---1
0275--S/R---77	0336-- 2 ---02	0397--XSQ---12	0458--XTO---2
0276-- 2 ---02	0337--DIV---35	0398-- UP---27	0459-- b ---1
0277-- 9 ---11	0338--XFR---67	0399--XFR---67	0460--FMT---4
0278-- 8 ---10	0339-- 4 ---04	0400-- 1 ---01	0461--FMT---4
0279--XFR---67	0340-- 0 ---00	0401-- 7 ---07	0462--SFL---5
0280-- 3 ---03	0341--DIV---35	0402--XSQ---12	0463--SFL---5
0281-- 9 ---11	0342--XFR---67	0403-- X ---36	0464--SFL---5
0282-- - ---34	0343-- 1 ---01	0404--XFR---67	0465--SFL---5
0283--YTO---40	0344-- 7 ---07	0405-- 0 ---00	0466--SFL---5
0284-- + ---33	0345-- UP---27	0406-- 9 ---11	0467--SFL---5
0285-- b ---14	0346--XFR---67	0407-- X ---36	0468--SFL---5
0286--XFR---67	0347-- 4 ---04	0408--XFR---67	0469--SFL---5
0287-- 1 ---01	0348-- 0 ---00	0409-- 1 ---01	0470--SFL---5
0288-- 5 ---05	0349--DIV---35	0410-- 0 ---00	0471--CLR---2
0289-- UP---27	0350-- DN---25	0411--XSQ---12	0472--CLR---2
0290-- YE---24	0351-- + ---33	0412-- UP---27	0473--FMT---4
0291-- 1 ---01	0352-- 1 ---01	0413--XFR---67	0474--GTO---44
0292-- 7 ---07	0353-- + ---33	0414-- 1 ---01	0475-- 0 ---0
0293--GTO---44	0354-- 2 ---02	0415-- 7 ---07	0476-- 9 ---1
0294--S/R---77	0355--DIV---35	0416-- X ---36	0477-- 2 ---1
0295-- 2 ---02	0356--YTO---40	0417--XFR---67	0478--END---
0296-- 9 ---11	0357-- 2 ---02	0418-- 0 ---00	
0297-- 8 ---10	0358-- 0 ---00	0419-- 8 ---10	
0298--XFR---67	0359--XFR---67	0420-- X ---36	
0299-- 1 ---01	0360-- 1 ---01	0421-- DN---25	
0300-- 7 ---07	0361-- 9 ---11	0422-- + ---33	
0301--XSQ---12	0362--DIV---35	0423-- DN---25	
0302-- UP---27	0363-- DN---25	0424--PNT---45	
0303--XFR---67	0364--XSQ---12	0425-- UP---27	
0304-- 0 ---00	0365-- UP---27	0426--PSE---57	
0305-- 3 ---03	0366--XFR---67	0427--S/R---77	

Apêndice 2

Determinação do menor resíduo quadrático médio, para estudos na etapa transiente, variando-se o valor da razão  $[k_2/(k_2 + k_3)]^2$  para determinados valores de pH e pKa.

0000--CLP---20	0061-- YE---24	0122-- 1 ---01
0001--FMT---42	0062-- π ---56	0123--XFR---67
0002--FMT---42	0063--FMT---42	0124-- 1 ---01
0003-- π ---56	0064--STP---41	0125-- 2 ---02
0004-- H ---74	0065--PNT---45	0126-- UP---27
0005--FMT---42	0066--XTO---23	0127-- YE---24
0006--STP---41	0067-- 2 ---02	0128-- 0 ---00
0007--PNT---45	0068-- 1 ---01	0129-- 2 ---02
0008--XTO---23	0069--STP---41	0130--XFR---67
0009-- 0 ---00	0070--PNT---45	0131-- 2 ---02
0010-- 3 ---03	0071--XTO---23	0132-- 2 ---02
0011--FMT---42	0072-- 2 ---02	0133-- UP---27
0012--FMT---42	0073-- 2 ---02	0134-- YE---24
0013-- π ---56	0074--STP---41	0135-- 0 ---00
0014-- K ---55	0075--PNT---45	0136-- 1 ---01
0015-- A ---62	0076--XTO---23	0137--GTO---44
0016--FMT---42	0077-- 2 ---02	0138--S/R---77
0017--STP---41	0078-- 3 ---03	0139-- 1 ---01
0018--PNT---45	0079--STP---41	0140-- 8 ---10
0019--XTO---23	0080--PNT---45	0141-- 7 ---07
0020-- 0 ---00	0081--PNT---45	0142--XTO---23
0021-- 4 ---04	0082--XTO---23	0143-- + ---33
0022--FMT---42	0083-- 2 ---02	0144-- α ---13
0023--FMT---42	0084-- 4 ---04	0145--XTO---23
0024--INT---64	0085--FMT---42	0146-- 4 ---04
0025-- A ---62	0086--FMT---42	0147-- 2 ---02
0026-- L ---72	0087-- K ---55	0148--XFR---67
0027--CNT---47	0088--FMT---42	0149-- 1 ---01
0028-- E ---60	0089-- 0 ---00	0150-- 3 ---03
0029-- 2 ---02	0090--XTO---23	0151-- UP---27
0030--XTO---23	0091-- α ---13	0152-- YE---24
0031--FMT---42	0092--STP---41	0153-- 0 ---00
0032--STP---41	0093--PNT---45	0154-- 2 ---02
0033--PNT---45	0094--PNT---45	0155--XFR---67
0034--XTO---23	0095--XTO---23	0156-- 2 ---02
0035-- 1 ---01	0096-- 0 ---00	0157-- 3 ---03
0036-- 1 ---01	0097-- 5 ---05	0158-- UP---27
0037--STP---41	0098--XFR---67	0159-- YE---24
0038--PNT---45	0099-- 1 ---01	0160-- 0 ---00
0039--XTO---23	0100-- 1 ---01	0161-- 1 ---01
0040-- 1 ---01	0101-- UP---27	0162--GTO---44
0041-- 2 ---02	0102-- YE---24	0163--S/R---77
0042--STP---41	0103-- 0 ---00	0164-- 1 ---01
0043--PNT---45	0104-- 2 ---02	0165-- 8 ---10
0044--XTO---23	0105--XFR---67	0166-- 7 ---07
0045-- 1 ---01	0106-- 2 ---02	0167--XTO---23
0046-- 3 ---03	0107-- 1 ---01	0168-- + ---33
0047--STP---41	0108-- UP---27	0169-- α ---13
0048--PNT---45	0109-- YE---24	0170--XTO---23
0049--XTO---23	0110-- 0 ---00	0171-- 4 ---04
0050-- 1 ---01	0111-- 1 ---01	0172-- 3 ---03
0051-- 4 ---04	0112--GTO---44	0173--XFR---67
0052--FMT---42	0113--S/R---77	0174-- 1 ---01
0053--FMT---42	0114-- 1 ---01	0175-- 4 ---04
0054--INT---64	0115-- 8 ---10	0176-- UP---27
0055-- A ---62	0116-- 7 ---07	0177-- YE---24
0056-- L ---72	0117--XTO---23	0178-- 0 ---00
0057--CNT---47	0118-- + ---33	0179-- 2 ---02
0058--CHS---32	0119-- α ---13	0180--XFR---67
0059--CNT---47	0120--XTO---23	0181-- 2 ---02
0060-- E ---60	0121-- 4 ---04	0182-- 4 ---04



## A.2.2.

0183-- UP---27  
 0184-- YE---24  
 0185-- 0 ---00  
 0186-- 1 ---01  
 0187--XFR---67  
 0188-- 0 ---00  
 0189-- 3 ---03  
 0190-- UP---27  
 0191-- 2 ---02  
 0192-- X ---36  
 0193--XFR---67  
 0194-- 0 ---00  
 0195-- 4 ---04  
 0196--XEY---30  
 0197-- - ---34  
 0198-- DN---25  
 0199-- K ---55  
 0200-- 5 ---05  
 0201--XTO---23  
 0202-- 0 ---00  
 0203-- 6 ---06  
 0204-- UP---27  
 0205--XFR---67  
 0206-- 0 ---00  
 0207-- 2 ---02  
 0208-- UP---27  
 0209-- 4 ---04  
 0210-- X ---36  
 0211-- DN---25  
 0212--XEY---30  
 0213--DIV---35  
 0214-- 0 ---00  
 0215-- . ---21  
 0216-- 2 ---02  
 0217-- 5 ---05  
 0218-- + ---33  
 0219-- DN---25  
 0220-- r ---76  
 0221-- UP---27  
 0222-- 0 ---00  
 0223-- . ---21  
 0224-- 5 ---05  
 0225-- - ---34  
 0226--XFR---67  
 0227-- 0 ---00  
 0228-- 6 ---06  
 0229-- X ---36  
 0230-- 4 ---04  
 0231--DIV---35  
 0232--XFR---67  
 0233-- 0 ---00  
 0234-- 2 ---02  
 0235-- + ---33  
 0236--XFR---67  
 0237-- 0 ---00  
 0238-- 5 ---05  
 0239-- X ---36  
 0240-- DN---25  
 0241--PNT---45  
 0242-- UP---27  
 0243--XFR---67  
 0244-- 0 ---00

0245-- 1 ---01  
 0246-- - ---34  
 0247-- DN---25  
 0248--PNT---45  
 0249--PSE---57  
 0250--S/R---77  
 0251--XTO---23  
 0252-- + ---33  
 0253-- a ---13  
 0254--XTO---23  
 0255-- 4 ---04  
 0256-- 4 ---04  
 0257--XFR---67  
 0258-- 4 ---04  
 0259-- 1 ---01  
 0260-- UP---27  
 0261-- 0 ---00  
 0262--XTO---23  
 0263-- b ---14  
 0264--XFR---67  
 0265-- 2 ---02  
 0266-- 1 ---01  
 0267--DIV---35  
 0268-- DN---25  
 0269--XSO---12  
 0270--XTO---23  
 0271-- + ---33  
 0272-- b ---14  
 0273--XFR---67  
 0274-- 4 ---04  
 0275-- 2 ---02  
 0276-- UP---27  
 0277--XFR---67  
 0278-- 2 ---02  
 0279-- 2 ---02  
 0280--DIV---35  
 0281-- DN---25  
 0282--XSO---12  
 0283--XTO---23  
 0284-- + ---33  
 0285-- b ---14  
 0286--XFR---67  
 0287-- 4 ---04  
 0288-- 3 ---03  
 0289-- UP---27  
 0290--XFR---67  
 0291-- 2 ---02  
 0292-- 3 ---03  
 0293--X=Y---50  
 0294-- 0 ---00  
 0295-- 3 ---03  
 0296-- 2 ---02  
 0297-- 2 ---02  
 0298--DIV---35  
 0299-- DN---25  
 0300--XSO---12  
 0301--XTO---23  
 0302-- + ---33  
 0303-- b ---14  
 0304--XFR---67  
 0305-- 4 ---04  
 0306-- 4 ---04

0307-- UP---27  
 0308--XFR---67  
 0309-- 2 ---02  
 0310-- 4 ---04  
 0311--X=Y---50  
 0312-- 0 ---00  
 0313-- 3 ---03  
 0314-- 2 ---02  
 0315-- 2 ---02  
 0316--DIV---35  
 0317-- DN---25  
 0318--XSO---12  
 0319--XTO---23  
 0320-- + ---33  
 0321-- b ---14  
 0322-- c ---61  
 0323--FMT---42  
 0324--FMT---42  
 0325--YTO---40  
 0326-- 0 ---71  
 0327-- M ---70  
 0328--CNT---47  
 0329-- D ---63  
 0330-- I ---65  
 0331-- F ---16  
 0332--CNT---47  
 0333--CHS---32  
 0334--FMT---42  
 0335--PNT---45  
 0336--PNT---45  
 0337-- DN---25  
 0338--FMT---42  
 0339--FMT---42  
 0340--YTO---40  
 0341-- 0 ---71  
 0342-- M ---70  
 0343--CNT---47  
 0344-- b ---14  
 0345--1/X---17  
 0346-- R ---62  
 0347-- D ---63  
 0348--CNT---47  
 0349-- a ---13  
 0350-- E ---60  
 0351--YTO---40  
 0352--FMT---42  
 0353--PNT---45  
 0354--PNT---45  
 0355--FMT---42  
 0356--FMT---42  
 0357--SFL---54  
 0358--SFL---54  
 0359--SFL---54  
 0360--SFL---54  
 0361--SFL---54  
 0362--SFL---54  
 0363--SFL---54  
 0364--SFL---54  
 0365--FNT---42  
 0366--GTO---44  
 0367-- 0 ---00  
 0368-- 0 ---10  
 0369-- 5 ---05  
 0370--END---46

## Apêndice 3

Determinação simultânea das curvas de recíproco da locidade versus o recíproco da concentração de substrato para concentrações altas e baixas de enzima e velocidade versus concentração total de enzima para determinados valores do conjunto de constantes, segundo o mecanismo proposto.

```

5 REM: TRACADO DOS EIXOS
10 FOR I=1 TO 4000
15 CALL "PLOT"(I,0)
20 CALL "PLOT"(I,1500)
25 CALL "PLOT"(I,3000)
30 NEXT I
35 DIM X1(40),Y1(40),X2(40),Y2(40),X3(40),Y3(40)
40 DIM A(40),B(40),C(40),E(40),F(40)
42 DIM V3(40),V2(40),V1(40),R3(40),R2(40),R1(40)
45 REM: ENTRADAS DAS CURVAS EXPERIMENTAIS
50 PRINT "NUMERO DE PONTOS DE OBSERVACOES="; \INPUT N
55 REM: CURVA 1: V EM FUNCAO DE S COM VALOR DE E2T ALTO
60 FOR I=1 TO N
65 INPUT #1: X1(I),Y1(I)
70 NEXT I
75 FOR I=1 TO N
80 CALL "PLOT"(X1(I)*4.50000E+06,Y1(I)*200*1.00000E+08)
82 FOR J=1 TO 1000 \NEXT J
85 NEXT I
90 REM: CURVA 2: V EM FUNCAO DE S COM VALOR DE E2T BAIXO
95 FOR I=1 TO N
100 INPUT #1: X2(I),Y2(I)
105 NEXT I
110 FOR I=1 TO N
115 CALL "PLOT"(X2(I)*4.50000E+06,1500+Y2(I)*1.00000E+12)
117 FOR J=1 TO 1000 \NEXT J
120 NEXT I
125 REM: CURVA 3: V EM FUNCAO DE E2T COM VALOR DE S=CTE
130 FOR I=1 TO N
135 INPUT #1: X3(I),Y3(I)
140 NEXT I
145 FOR I=1 TO N
150 CALL "PLOT"(X3(I)*800*1.00000E+08,3000+Y3(I)*200*1.00000E+08)
152 FOR J=1 TO 1000 \NEXT J
155 NEXT I
160 REM: ENTRADA DAS CONSTANTES
165 K1=5.00000E-10 \ K2=1.00000E-03 \ K3=.912 \ K4=55
170 K5=.67 \ K6=.75
175 REM: VALORES INICIAIS DE X8 E K9
180 X8=6.70000E-04 \ K9=.055
205 FOR I=1 TO N
210 A(I)=0 \ B(I)=0 \ C(I)=0 \ E(I)=0 \ V1(I)=0 \ V2(I)=0 \ V3(I)=0
215 F(I)=0 \ R1(I)=0 \ R2(I)=0 \ R3(I)=0
220 NEXT I
230 REM: CALCULO DE V EM FUNCAO DE E2T PARA VALOR DE S =CTE
232 S=3.00000E-04
235 FOR I=1 TO N
240 A(I)=(1/K1)*(1+S/K9+(S^2)/(K9*K3))
245 B(I)=.5*(1+S/K8+(S^2)/(K6*K2))
250 C(I)=(B(I)/A(I))^2+4*X3(I)/A(I)
255 E(I)=.5*(SQR(C(I))-B(I)/A(I))

```

## A.3.2.

```

257 F(I)=S+E(I)
260 V3(I)=K5*F(I)/K8+(K6*F(I)*E(I))/(K1+K9)+(K4*F(I)*F(I))/(K1+K9*K
265 R3(I)=V3(I)-V3(I)
270 PRINT "X3(I)=",X3(I); "Y. EXP.=",Y3(I)
272 PRINT "V. CALC=",V3(I); "RESID=",R3(I)
275 CALL "PLOT"(X3(I)*300+1.00000E+06,3000+V3(I)*200*1.00000E-08)
280 NEXT I
282 PRINT \PRINT
285 REM.CALCULO DE V EM FUNCAO DE S PARA E2T BAIXO
287 E2=8.33000E-10
290 FOR I=1 TO N
295 A(I)=(1/K1)*(1+X2(I)/K9+(X2(I)^2)/(K9+K3))
300 B(I)=.5*(1+X2(I)/K8+(X2(I)^2)/(K8+K2))
305 C(I)=(B(I)/A(I))^2+4+E2/A(I)
310 E(I)=.5*(SOR(C(I))-B(I)/A(I))
315 F(I)=X2(I)*E(I)
320 V2(I)=K5*F(I)/K8+(K6*F(I)*E(I))/(K1+K9)+(K4*F(I)*F(I))/(K1+K9*K
325 R2(I)=V2(I)-V2(I)
330 PRINT "X2(I)=",X2(I); "Y. EXP.=",Y2(I)
332 PRINT "V. CALCUL=",V2(I); "RESID=",R2(I)
335 CALL "PLOT"(X2(I)*4.50000E+06,1500+V2(I)*1.00000E+12)
340 NEXT I
342 PRINT \PRINT
345 REM.CALCULO DE V EM FUNCAO DE S PARA E2T ALTO
347 E2=2.22000E-08
350 FOR I=1 TO N
355 A(I)=(1/K1)*(1+X1(I)/K9+(X1(I)^2)/(K9+K3))
360 B(I)=.5*(1+X1(I)/K8+(X1(I)^2)/(K8+K2))
365 C(I)=(B(I)/A(I))^2+4+E2/A(I)
370 E(I)=.5*(SOR(C(I))-B(I)/A(I))
375 F(I)=X1(I)*E(I)
380 V1(I)=K5*F(I)/K8+(K6*F(I)*E(I))/(K1+K9)+(K4*F(I)*F(I))/(K1+K9*K
385 R1(I)=V1(I)-V1(I)
390 PRINT "X1(I)=",X1(I); "Y. EXP.=",Y1(I)
392 PRINT "V. CALC=",V1(I); "RESID=",R1(I)
400 CALL "PLOT"(X1(I)*4.50000E+06,V1(I)*200*1.00000E+08)
405 NEXT I
410 PRINT "OS VALORES PARA QUAIS ESSAS CURVAS FORAM TRACADOS SAO."
411 PRINT "K1=",K1,"K2=",K2
412 PRINT "K3=",K3,"K4=",K4
413 PRINT "K5=",K5,"K6=",K6
415 PRINT "K8=",K8,"K9=",K9
417 PRINT \PRINT
420 PRINT "SE NECESSARIO MODIFICAR OS PARAMETROS BATENDO OS NOVOS"
425 PRINT "VALORES DE K8 E K9"
430 PRINT "E DEPOIS BATER GO TO 205"
435 STOP

```

READY